UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931 N° 69

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LEVURES ROSES

Essais d'isolement et de caractérisation chimique et physique de la substance chromogène oxycétonique sécrétée par deux levures du genre Cryptococcus

---

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le juillet 1931
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

JEAN HENRY
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
F. JADIN „ } *JUGES*
LOBSTEIN „ }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1931

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931 N° 69

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LEVURES ROSES

Essais d'isolement et de caractérisation chimique et physique de la substance chromogène oxycétonique sécrétée par deux levures du genre Cryptococcus

---

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le juillet 1931
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

JEAN HENRY
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
F. JADIN ,, } *JUGES*
LOBSTEIN ,, }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1931

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. JADIN, *Doyen*, O ❋, I ⚲, ⚷
A. SARTORY, *Assesseur*, C. ❋, I ⚲, O ⚷
CUVIER, *Secrétaire*.

PROFESSEURS

MM.	JADIN, O ❋, I ⚲, ⚷	Pharmacie chimique.
	A. SARTORY, C. ❋, I ⚲, O ⚷	Bactériologie.
	LAVIALLE, I ⚲, ⚷	Botanique.
	LABORDE, ❋, I ⚲	Chimie organique
	VOLMAR, I ⚲	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ❋, ⚷, I ⚲	Matière médicale.
	GUILLAUME, ❋, ⚷, ⚲	Pharmacie galénique

PROFESSEUR HONORAIRE

M. BRÆMER, ❋, I ⚲, O ⚷

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ❋, I ⚲	Chimie biologique.
	GUILLAUME, ❋, ⚷, ⚲	Zoologie.
	VOLMAR, I ⚲	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ❋, ⚷, I ⚲.....	Hydrologie et Hygiène.
	BRÆMER, ❋, I ⚲, O ⚷	Législation et Déontologie
	LAPP, A. ⚲	Physique.
	COLLARD, I ⚲, ⚷	Toxicologie.
	R. SARTORY	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, A. ⚲	Chimie pharmaceutique.
	COLLARD, I ⚲ ⚷,.....	Chimie et Physique.
	BOHN.....	Histoire naturelle.
	R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie.

A MON FRÈRE

Témoignage d'affectueuse reconnaissance

A MA CHÈRE ÉPOUSE

Témoignage de vive affection

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548008_0077

A Monsieur A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'Honneur
Président du Jury de ma Thèse

A MES JUGES :

Monsieur JADIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg
Chevalier de la Légion d'Honneur

Monsieur LOBSTEIN

Professeur à la Faculté
de Pharmacie de Strasbourg
Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de profonde gratitude

INTRODUCTION

La plupart des microorganismes (bactéries et champignons), lorsqu'ils sont examinés alors qu'ils se trouvent réunis en amas plus ou moins compacts, paraissent presque toujours colorés. Les causes de cette illusion d'optique résident ordinairement dans la présence de matières grasses à l'intérieur des cellules.

Cependant on réserve le qualificatif de chromogènes aux microorganismes qui sont vraiment colorés, c'est-à-dire qui présentent une teinte même lorsqu'ils sont examinés sous une faible épaisseur. Toutefois, il peut arriver qu'une cellule colorée paraît incolore lorsqu'elle est examinée seule, ceci à cause de sa petitesse.

Les nuances de ces pigments sont extrêmement variées : le rouge plus ou moins foncé s'observe beaucoup chez les bactéries *(Micrococcus prodigiosus, Spirillum rubrum)*. Le jaune est assez commun *(Sarcina lutea, Staphylococcus aureus)* ; cette couleur varie du jaune pur au jaune orangé. Le bleu est assez rare : *(Bacille du lait bleu, Bacillus pyocyaneus)*. Van Tieghem a pu mettre en évidence un pigment vert chez le *Bactérium viride* et le *Bacillus vireus*. Le *Bacillus chlororaphis* a le pouvoir de produire dans certains milieux des houpettes cristallines colorées en vert.

En ce qui concerne les champignons inférieurs, ces teintes sont aussi multiples. On peut signaler dans les rouges et les jaunes les pigments des *Urédinées*, du *Calocera viscosa*, du *Nectria cinnabarina*. Les levures aussi donnent des pigments rouges ou jaunes orangés *(Cryptococcus glutinis, Levures roses* de Koch). On connaît la teinte brun violet de l'*Ergot de seigle*, noire de l'*Aspergillus niger*.

On doit distinguer les pigments qui colorent les microorganismes et ceux qui, excrétés par ceux-ci, diffusent dans

le milieu de culture sans que pour cela l'organisme soit coloré. Les couleurs pigmentaires vraies sont les résultantes de l'élaboration par la matière vivante végétale ou animale de substances spéciales. On est donc amené à distinguer des pigments endogènes lorsqu'ils restent inclus dans la cellule qui les a formés et des pigments exogènes lorsque, après leur production par un être vivant, ils sont amenés et fixés sur un organisme ou une substance secondaire intervenant comme fixateur et non comme élaborateur. Les bactéries et les champignons inférieurs croissant sur divers milieux, lorsqu'ils sont chromogènes, communiquent presque nécessairement à ce substrat des colorations spéciales. Avant la découverte des infiniment petits on rapportait les changements de couleur d'une matière organique à une modification de la nature de cette substance sans aller plus loin.

Le changement de coloration de l'eau, des matières alimentaires, des substances inertes ont été observés dès les temps les plus anciens mais les causes, le mécanisme de ces phénomènes sont restés longtemps inconnus. A vrai dire, les résultats n'ont pas toujours été satisfaisants; les connaissances sur ce point n'ont guère fait de progrès depuis les recherches des précurseurs dans le domaine chimique et bactériologique.

La question des pigments végétaux n'a pas tenté un grand nombre de savants sans doute à cause des difficultés nombreuses qui en jalonnent le chemin. Cependant la fonction chromogène des êtres vivants, des végétaux en particulier, est primordiale : que de faits expliqués, que d'hypothèses vérifiées ou détruites par l'étude de l'hémoglobine, de l'hémocyanine chez les animaux, par les recherches approfondies sur la chlorophylle, l'anthocyane et les pigments assimilateurs végétaux. On se rend compte de l'utilité de l'étude des différentes significations fonctionnelles qui peuvent être attribuées aux pigments. Les unes participent des propriétés propres aux pigments, les autres interviennent dans des phénomènes secondaires, dans les processus vitaux; il est alors facile de comprendre l'interprétation théorique que l'homme en fait, se basant uniquement sur les faits physiologiques ou biologiques qu'il lui a été donné d'observer, sans pouvoir apporter des preuves réelles sur leur fonction.

On comprend donc tout l'intérêt d'une semblable question, quand il s'agit d'êtres privés de chlorophylle et qui, à un moment donné de leur évolution secrètent une matière colorante. Quelle est la nature de ce pigment ? quels sont les processus chimiques et cytologiques de cette génèse et les conditions physiologiques qui la règlent ? enfin quelle est la signification fonctionnelle et le rôle de cette couleur pour la conservation ou la défense de l'espèce ?

Pour élucider ces différents problèmes un grand pas en avant a été réalisé par les travaux remarquables, relativement récents de GESSARD, MOLISCH, LASSEUR, THIRY, CHAMOT et VERNES; ces auteurs ont apporté en effet dans cette voie un certain nombre de faits nouveaux qui orientent nettement cette partie de la science vers des idées concrètes. De plus, l'école de WILLSTÆTTER et celle de WREDE ont réussi à résoudre après des recherches difficiles et patientes, certains problèmes de la genèse pigmentaire organique et à expliquer par l'analyse et la synthèse la constitution chimique de ces substances plus ou moins complexes.

Sur les conseils de notre cher maître, monsieur le Professeur A. SARTORY, nous avons essayé d'affronter ces problèmes délicats et d'apporter ainsi une contribution à l'étude des pigments végétaux par nos recherches sur des microorganismes intéressants à la fois par leurs propriétés chromogènes et leur pouvoir eventuellement pathogène.

Nous envisageons principalement ici l'étude des *levures chromogènes ;* notre travail se divise en deux parties : dans la première nous exposons l'historique de la question, réservant le premier chapitre à l'étude des levures et de leur place dans la classification cryptogamique. Le deuxième chapitre est consacré à l'histoire des levures chromogènes et dans le troisième nous envisageons les propriétés et la classification relatives aux pigments des microorganismes.

La deuxième partie comprend l'exposé de nos recherches personnelles : tout d'abord l'étude morphologique, biologique et biochimique de deux nouveaux organismes isolés au laboratoire : d'une part *Cryptococcus corallinus* et de l'autre *Cryptococcus radiatus*. Le troisième chapitre constitue l'ensemble de nos recherches sur les pigments de ces deux cham-

pignons inférieurs et sur les propriétés de ces matières chromogènes. Enfin dans le dernier chapitre nous nous livrons à une étude comparative des principaux pigments des levures.

Ce travail a été élaboré et mis au point dans le *Laboratoire de Bactériologie et Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg :* nous prions notre cher maître, monsieur le professeur A. SARTORY, de bien vouloir agréer ici l'expression de toute notre reconnaissance. Sa haute compétence dans la matière et sa longue expérience ont grandement facilité notre tâche et aplani bien des difficultés

Nous adressons également l'expression de toute notre gratitude à monsieur le professeur JADIN, doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ainsi qu'à monsieur le professeur LOBSTEIN, qui ont accepté tous deux de faire partie de notre jury de thèse.

Notre reconnaissance et nos sincères remerciements à monsieur René SARTORY, Chargé de cours et J. MEYER, Assistant à la Faculté qui avec amabilité et bienveillance ont bien voulu nous guider dans nos recherches; leurs connaissances en matière de cryptogamie nous furent une aide particulièrement précieuse.

Nous dédions ce travail à la mémoire de notre oncle vénéré, Ernest MONAL, pharmacien de 1re classe, ancien chef des travaux chimiques et bactériologiques à la Faculté des Sciences de Nancy.

Nous l'offrons en hommage reconnaissant et dévoué à notre cher oncle monsieur Emile MONAL, docteur en pharmacie.

Ils ont guidé nos premier pas dans l'art pharmaceutique et ont éveillé en nous le goût de la recherche scientifique.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE Ier

Caractères généraux des levures; leur place dans la classification

Afin de situer aussi exactement que possible les organismes dont nous avons entrepris l'étude et de leur accorder une place précise dans la classification mycologique, nous passerons en revue les essais systématiques les plus intéressants concernant les champignons inférieurs.

Avant tout, nous nous devons de citer ici la classification adoptée par LINDAU (1) : elle distingue deux groupes principaux :

I. *Hémiascées :* champignons inférieurs ne possédant pas d'asques nettement différenciés.

II. *Enascées* : champignons inférieurs à asques régulièrement formés.

On divise ce deuxième groupe en trois sous-groupes :

a) Exoascées : chez ces organismes les asques sont nus et libres, rattachés au mycelium;

b) Plectascées : dont les asques sont munis d'une légère enveloppe;

c) enfin dans le troisième sous-groupe on range les formes les plus parfaites, chez lesquelles l'appareil sexué se

développe uniquement en des endroits définis du mycelium et se trouve muni d'une enveloppe tout à fait différenciée : ce sont :

1° les *Discomycètes* produisant des périthèces ouverts;

2° les *Pyrénomycètes* avec des périthèces fermés.

Nous citerons ensuite la classification élaborée par notre cher maître, monsieur le professeur A. SARTORY (2), qui distingue quatre familles :

1° les *Hémiascées*, intermédiaires entre les *Phycomycètes* et les *Ascomycètes:* les asques possèdent des spores nombreuses;

2° les *Pézizacées* qui comprennent comme tribus : les *Protoascées*, les *Exoascées*, les *Pezizées*, les *Ascobolées*, les *Patellariées*, les *Phacidiées*, les *Hystériacées*. Dans la première tribu des *Protoascées* se rangent les *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces*, *Endomyces*, etc.

3° les *Sphaeriacées*: champignons à périthèces toujours clos et s'ouvrant à maturité par un pore. Le périthèce est généralement petit, globuleux, en forme de bouteille, laissant sortir à maturité une sorte de gelée renfermant des ascospores.

4° les *Périsporiacées:* le thalle se développe dans la matière organique en décomposition ou vit en parasite à la surface de feuilles et de tiges. Il peut se trouver dans la terre où il produit un périthèce; chez certaines espèces on observe la production d'un appareil conidien. Dans cette famille il faut citer la tribu des *Gymnoascées*, dans laquelle l'auteur range les champignons des genres *Trichophyton*, *Microsporum*, *Achorion*, *Epidermophyton* constituant le grand groupe des champignons parasites des *teignes ;* c'est dans la même famille que sont classées les *Périsporiées* avec les genres *Aspergillus*, *Sterigmatocystis*, *Penicillium*.

Dans sa classification des *Hyphomycètes* VUILLEMIN (3) distingue trois groupes : les *Conidiosporées* qui présentent des conidies bien différenciées dès leur apparition : ces végétaux se divisent en cinq sections : *Aleuriosporées*, *Sporotrichées*, *Sporophorées*, *Phialidées* et *Prophialidées*.

Les *Thallosporées* caractérisés par une reproduction s'opérant au moyen de thallospores, produites par le morcellement du thalle sans aucune différenciation particulière :

ce groupe est partagé en deux sous-groupes : les *Blastosporées* ou *Blastomycètes* et les *Arthrosporées* ou *Arthromycètes*. Les *Blastosporées* qui comprennent les genres *Cryptococcus, Monilia, Cladosporium, Malassezia* se distinguent des autres Thallosporées par la nature des thallospores appelées ici blastospores : ce sont des globules arrondis ou ovoïdes en forme de levures, naissant par bourgeonnement du pourtour des filaments longs ou réduits eux-mêmes à des globules. Les blastospores continuent à se multiplier et il n'y a aucun arrêt dans leur vie végétative, comme cela peut se constater chez les champignons à conidies. Les *Arthrosporées* avec les genres principaux : *Mycoderma, Madurella, Indiella, Epidermophyton* et les champignons des *teignes* possèdent des arthrospores, c'est-à-dire des thallospores résultant de la desarticulation simple des filaments végétatifs. Coupés carrément à l'origine ces tronçons peuvent s'arrondir, épaissir leur membrane et concourir ainsi à la multiplication de l'espèce.

Vuillemin a séparé de ce sous-groupe les *Microsiphonées* caractérisés par leur mycelium continu de calibre très réduit et ténu, se rapprochant ainsi des bactéries et par leur mode de reproduction au moyen d'arthrospores, des *Arthrosporées*. Ce groupe renferme les *Actinomyces*.

Se basant sur cette classification de Vuillemin fondée sur des caractères botaniques nettement définis, Guilliermond (4) a tenté d'ordonner le groupement des Thallosporées, en rangeant les divers organismes en familles et sous-familles. Il distingue tout d'abord deux familles : les *Saccharomycétacées* et les *Non-Saccharomycétacées*. Les *Saccharomycétacées* sont caractérisés par une multiplication aséxuée par bourgeonnement ou cloisonnement et une reproduction séxuée au moyen d'asques et d'ascospores. Cette famille est divisée en cinq groupes : dans le premier groupe Guilliermond range le genre *Schizosaccharomyces* se multipliant par cloisonnement ; le deuxième groupe renferme les levures bourgeonnantes avec les genres *Zygosaccharomyces, Debaryomyces, Schwaniomyces, Torulaspora, Nadsonia*. Le troisième groupe comporte des levures bourgeonnantes capables d'une reproduction sexuée par ascospores, à pouvoir fermentatif dégradant les matières sucrées avec production d'alcool : dans ce groupe l'auteur distingue les genres *Saccharomycodes, Saccharomycopsis,*

Saccharomyces et *Hansenia*. Le quatrième groupe comprend les genres *Pichia* et *Willia*, qui sont différenciés par le pouvoir fermentatif, ne donnant généralement pas d'alcool, mais des éthers à partir des matières ternaires. Le cinquième groupe renferme des levures à reproduction sexuée mais à affinités mal connues : on distingue deux genres: *Monospora* et *Nematospora*.

La famille des *Non-Saccharomycétacées* est caractérisée par des formes levures bourgeonnantes, dépourvues de reproduction sexuée par asques. Cette famille se compose des trois genres : *Torula, Mycoderma* et *Cryptococcus*. C'est dans ce dernier genre que rentrent les deux espèces dont nous avons fait l'étude.

Ota (5) dans une nouvelle classification distingue les levures, qui produisent des spores et qui appartiennent à la famille des *Saccharomycètes*: ces organismes se rapportent aux genres : *Saccharomyces, Willia* et *Debaryomyces*. Parmi les levures qui ne forment pas de spores, il distingue :

1° les *Cryptococcus* ne présentant jamais de forme filamenteuse;

2° les *Cryptococcus* présentant parfois des formes filamenteuses et montrant des formes de transition entre les genres *Cryptococcus* et *Monilia*;

3° les *Monilia* qui offrent toujours des formes filamenteuses assez développées en même temps que des aspects levures. L'auteur distingue par conséquent dans un premier essai de classification deux groupes :

a) groupe des *Saccharomycètes ;*

b) groupe des *Levures* ne sporulant pas, subdivisées en trois catégories, que nous avons vues plus haut.

Dans un deuxième travail Ota (6) reprend ses recherches sur la classification des *Blastomycètes anascosporées*, il renonce à les répartir comme Vuillemin et les autres classiques dans les genres *Cryptococcus et Monilia*. Il ne conserve dans le genre *Cryptococcus* Kutzing 1845 que les levures ne donnant jamais de filaments, ni d'ébauches de filaments. Il crée un deuxième genre qui forme des mycéliums ou des ébauches

de mycélium, englobant les *Hyphomycètes blastosporés*. Ce genre est appelé par lui *Myceloblastanon:* il est subdivisé en trois nouveaux sous-genres; les *Blastodendrion* caractérisés par des arbuscules de blastospores qui, par désagrégation donnent des formes ovales ou allongées de levure. Les *Mycelorhizodes* qui possèdent à la fois des blastospores semblables aux formes *Cryptococcus* et un mycélium filamenteux. Les *Monilia* sont pris dans un autre sens que celui des classiques : elles présentent dans les cultures à la fois des arbuscules de blastospores et des filaments mycéliens. D'autre part les *Hyphomycètes arthrosporées* possédant des blastopores se répartissent entre les deux genres *Parendomyces* de DE BEURMANN et GOUGEROT, qui sont caractérisés par la coexistence de chaînettes d'arthrospores et de blastospores vraies, et les *Mycoderma* PERSOON qui, à un état précoce de développement, peuvent présenter aussi des blastospores.

Cette classification, par sa complication, ne paraît pas devoir faciliter la tâche des mycologues; aussi croyons-nous devoir nous rallier à celle édifiée par VUILLEMIN qui repose sur des bases scientifiques solides et met en valeur les caractères botaniques des organismes.

Chapitre II

Les champignons chromogènes

Chez les cryptogames ce sont surtout les couleurs jaune, orangé et rouge qui prédominent; parfois elles sont dues à des carotinoïdes qui s'y sont développés en l'absence de la chlorophylle qu'ils accompagnent chez les végétaux verts. Cette catégorie de pigments est assez bien connue.

Les autres matières colorantes nous sont encore obscures : ce sont des composés *flavoniques* et *anthraquinoniques*, des *porphyrines*, des substances solubles dans le chloroforme du groupe de l'*indol* par exemple.

La plus grande partie des champignons pigmentés en jaune-orange et en rouge renferme des substances appartenant au groupe des carotines. Si l'on en croit Zopf (7) les pigments jaunes rougeâtres qui apparaissent chez les *Phycomycètes* (*Pilobolus, Mucor)* se rapporteraient aussi au groupe des carotines; chez ces organismes le pigment revêt le forme de petites gouttelettes oléagineuses.

La *pezizaxanthine* que Sorby (8) a décrit dans *Aurelia aurantiaca* est sans doute identique à la *carotine.*

Zopf (9) plus tard indique que la carotine provenant des *Hypocréacées* n'a pas le caractère de la carotine du *Daucus;* c'est ainsi que le *Polystigma rubrum* renfermerait deux pigments dont le rouge est prédominant. Le *Polystigma ochraceus* Wahlenb contient une substance qui est une carotine jaunâtre, cristallisable, se distinguant nettement de la précédente. On connaît la matière colorante jaune et le pigment rouge extraits tous deux du *Nectrina cinnabarina.* Le pigment du *Ditiola radicata* est identique à la carotine trouvée dans le *Calocera.*

Zopf a appelé les carotines jaunes : lipo-xanthines; il a donné le nom de lipo-rhodines aux carotines rouges.

Ce même auteur (1) classe la polystigmine et la nectriine dans le groupe des carotinines ou carotines oxydées. Chez les *Myxomycètes* Zopf a démontré la plupart du temps la présence de carotine particulièrement pour les *Stemonitis* et les *Lycogala*. En ce qui concerne ce dernier genre la caractérisation du pigment se fait par la présence dans le spectre de quatre bandes d'absorption caractéristiques; cette matière colorante fait partie de la série jaune des carotines.

Des travaux sur les *Saccharomycétacées* ont également démontré chez ces levures la présence de carotines; le premier mémoire semble être celui de Demme (11) sur le Saccharomyces ruber, espèce trouvée dans le lait; on l'a incriminée dans le processus pathologique de la diarrhée infantile.

Mais à vrai dire, c'est Fresenius (12) qui, le premier, mentionne dans ses « Contributions à l'étude de la Mycologie » une levure rouge: le *Cryptococcus glutinis*. Après lui Schröter (13) a signalé en 1872 une levure rose, dont les membranes et le contenu cellulaire sont incolores, mais qui a le pouvoir de teinter le milieu de culture en rouge. Nous devons ici citer les quelques recherches publiées par Koch et ses élèves sur des levures roses : les auteurs ont étudié ces organismes au point de vue morphologique et biologique, mais les travaux serrés et détaillés sur ce point sont dus à Hansen (14) et Lindner (15).

Elfvings (16) a décrit un Saccharomyces rouge se développant dans une solution aqueuse de sulfate de magnésie et de nitrate de potassium en présence d'une trace de chlorure de fer et sous l'influence de la lumière. L'auteur tente de démontrer que la vie de cette espèce n'est possible dans des radiations solaires, que grâce à l'existence du pigment rouge qu'elle élabore. Laurent (17) a pu isoler une forme évolutive du *Cladosporium herbarum* provenant de myrtilles sèches; cette espèce présente l'aspect d'une levure rose. Le colorant n'a fait son apparition qu'en la présence de la lumière. A l'obscurité aucun phénomène de chromogenèse n'a pu être observé. Deux levures rouges : *Mycoderma humili* et *Mycoderma rubrum* sont décrites en 1892 par Laschè (18). Chez ces organismes, dans les cultures, le voile superficiel est teinté en rouge et la coloration est plus foncée en milieu acide qu'en

milieu légèrement alcalin. A l'examen minutieux, ces deux espèces semblent se trouver en proche parenté avec la *Torula n°* 36 décrite par JANSEN et MERTENS (19). Cet organisme est aussi très sensible à l'action de la lumière; à l'obscurité les cellules qui constituent le voile sont hypertrophiées et le voile même est moins coloré. Les cellules situées à la périphérie du voile sont les plus colorées; elles constituent un anneau qui se colle aux parois; leur protoplasme est bourré de corpuscules très réfringents à aspect graisseux et dont la teinte est rouge-orangée. Ce champignon, tout comme le *Blastoderma salmonicolor* décrit par FISCHER et BREBECK (20), a la propriété de donner une coloration saumon dans sa végétation superficielle; on a vu que ce phénomène était dû a un pigment du groupe des carotines.

WEHMER (21) et VUILLEMIN (22) de 1900 à 1902 fournissent des observations très intéressantes, relatives au *Mucor rouxii*, champignon de la levure chinoise qui, cultivé sur riz, produit un pigment jaune orangé très caractéristique qui apparaît sous forme de gouttelettes à l'intérieur de la cellule et qui peut être obtenu à l'état cristallisé. Le même colorant se forme en outre si l'on cultive ce champignon sur milieu de pomme de terre en présence de bactéries saprophytes. Sur des solutions sucrées le champignon reste incolore.

On trouve dans les travaux de MILBURN (23) sur l'*Hypocrea rufa* et de BESSEY (24) sur différents genres de *Fusarium* un grand nombre d'observations qui intéressent les variations du pigment sous l'influence des facteurs extérieurs.

PRINSEN-GEERLIGS (25) et BOORSMA (26) font l'étude du pigment rouge très intense produit par le *Monascus purpureus ;* cette matière colorante est soluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme.

Le pigment foncé des conidies de l'*Aspergillus niger*, appelé *aspergilline* est, d'après les recherches de LINOSSIER (27) une substance soluble, donnant une coloration brun rougeâtre aux solutions ammoniacales et aux solutions alcalines diluées.

Le colorant brun violet de l'ergot de seigle a été examiné par VAUQUELIN (28) et plus tard par DRAGENDORFF (29).

Sur les matières colorantes cryptogamiques rouges les travaux concernent surtout les champignons supérieurs : A. Weiss (30) effectue l'analyse des pigments de plusieurs espèces de *Russula ;* Reinke (31) étudie la *mycoporphyrine* cristallisable du *Penicilliopsis clavariiformis ;* Philipson (32) s'attache à la rubérine de l'*Agaricus ruber,* Griffiths (33) établit la formule de l'amanitine Taylor (34) détermine le pigment rouge carmin des *Lactaires,* Bachmann (35) examine le colorant violet du *Lactarius deliciosus.*

Zopf (36) a pu isoler un pigment rouge chez certaines *Téléphoracées;* il a obtenu la matière colorante à l'état cristallisé. Le même auteur retire des genres de *Bulgaria* la *bulgariine* et la *bulgarcoeruléine,* pigments rouges et bleus. Oudemans (37) étudie l'acide rhizopogonique provenant du *Rhizopogon rubescens.*

Stahlschmidt (38) obtient à l'état cristallisé l'acide polyporique colorant des *Polypores.* Thiry (39) examine le colorant rouge de l'*Actinomyces mordoré.*

A. Sartory et G. Bainier (40) isolent en 1911 deux espèces d'*Aspergillus,* qu'ils appellent *A. disjunctus* et *A. sejunctus* qui produisent un pigment rouge particulier. La matière colorante est très soluble dans l'alcool fort, la glycérine, l'éther, le chloroforme, le sulfate de carbone, la benzine. La même année les deux auteurs précédents (41) découvrent un *Penicillium* nouveau qui sur milieux peptonés (bouillon, gélatine ou gélose) secrète un pigment vert émeraude correspondant à la teinte nº 326 du code des couleurs.

Ce pigment résiste aux acides minéraux et organiques. L'eau de chlore, le bisulfite de soude, les hypochlorites alcalins, l'eau oxygénée ne provoquent aucune décoloration.

En 1912 A. Sartory et Bainier (42) étudient deux penicillium : *P. divergens* et *P. citricolum* qui secrètent un pigment que les auteurs ont examiné chimiquement et spectroscopiquement. L'un d'eux : celui du *P. citricolum* a pu être obtenu à l'état cristallisé. Tous deux sont solubles dans les dissolvants des graisses et peuvent être rangés dans la classe des *lipochromes* de Zopf.

En 1914 Sartory et Orticoni (43) font l'étude d'un *Cryptococcus* et d'un *Oidium* secrétant des pigments roses.

A. Sartory et Bainier (44) isolent du *Penicillium petchii* un pigment jaune. Signalons ici l'*Aspergillus mutabilis* (45) des mêmes auteurs qui doit son nom à la facilité avec laquelle il passe par toute une série de colorations : jaune serin, jaune ochracé (n° 165 du code des couleurs), jaune plus foncé (n° 161 du code des couleurs), jaune vert (n° 253 du code des couleurs), vert foncé (n° 258 du code des couleurs), vert noir (n° 305 du code des couleurs). Cette espèce secrète un pigment rouge qui est insoluble dans l'eau ordinaire, soluble dans l'eau alcalinisée au moyen de la potasse ou de la soude en très légère quantité. Il est insoluble dans tous les réactifs des corps gras. L'*Aspergillus repandus* a une coloration verte au début, qui fonce (n° 210 du code des couleurs) avec apparition de teintes violacées par places vers la fin de la végétation. L'organisme secrète un pigment rouge soluble dans l'alcool . Ce pigment n'est pas détruit par l'acide azotique. Sa couleur est avivée par l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique. Avec l'ammoniaque et la soude il vire au bleu.

A. Sartory et Bainier (46) dans un mémoire décrivent l'*Aspergillus Scheeleï* qui tire son nom de la couleur vert, laquelle jaunit un peu vers la fin de la végétation. Il produit un pigment jaune soluble dans les principaux dissolvants des graisses. Celui-ci n'est pas soluble dans l'eau. Les acides azotique, sulfurique, chlorhydrique sont presque sans action sur lui. Il en est de même des alcalis. Les auteurs font rentrer cette matière colorante dans la classe des *lipochromes* de Zopf. L'*Aspergillus umbrosus* est d'un vert noir, voisin de la nuance n° 209 du code des couleurs.

Les mêmes auteurs ont pu passer en revue quelques champignons appartenant au genre *Citromyces* (47), dont plusieurs sont producteurs de pigment : le *Citromyces ramosus* produit sur gélatine et gélose un pigment de couleur rose, puis fleur de pêcher ; ce caractère est constant. Le *Citromyces cesiae* trouvé dans une galerie de cesia apiformis creusée dans un peuplier. Il secrète un pigment d'un rouge intense qui rentre dans la catégorie des *lipochromes* de Zopf. Le *Citromyces musae* donne un pigment rouge identique au précédent. Le *Citromyces cyaneus* produit deux pigments : l'un jeune ver-

dâtre, l'autre rouge. Le *Citromyces Bruntzii* secrète un pigment mauve particulier. Enfin A. SARTORY et BAINIER ont pu mettre en évidence chez le *Trichoderma Deroschii* un pigment rouge violacé et chez le *Diplocladium elegans* un pigment rose; ce dernier était soluble dans l'alcool, l'éther, l'acétone, la benzine, le sulfure de carbone, insoluble dans l'eau et l'alcool amylique. La couleur du pigment est avivée par addition d'une trace d'un acide minéral. Il est décoloré par les alcalis et les décolorants habituels (eau de chlore, brome, iode).

Chapitre III

Les principales substances chromogènes végétales étudiées jusqu'à présent

Les premières recherches sérieuses concernant la matière datent de la fin du XIXe siècle : les auteurs s'efforcèrent de mettre en lumière les caractères de solubilité, l'influence de l'acidité ou de l'alcalinité, des réducteurs et des oxydants sur les pigments isolés.

Depuis l'essor prodigieux de la physique et surtout l'affranchissement des sciences nouvelles que celle-ci à engendrée et parmi lesquelles au premier plan se place la spectrographie (la plus précieuse pour le scientifique étudiant les pigments), a bouleversé toutes les données, toutes les techniques antérieures et la chimie-physique a doté le chercheur bactériologiste du spectrographe, instrument devenu indispensable complément du microscope.

Vu la complexité des pigments et la difficulté de leur étude, il est nécessaire de dire un mot, tout d'abord, sur leur classification. On a cherché à les ranger en groupements plus ou moins artificiels en se basant sur leur localisation anatomique, sur leur fonction réelle ou présumée. Logiquement le premier caractère à utiliser était la notion couleur; on les a donc répartis avant tout suivant leur teinte, puis suivant leur état d'agrégation; nous sommes donc en présence d'un classement opéré suivant des faits de nature physique. L'observation a révélé la présence chez les êtres vivants de pigments de teinte très variées : on peut dire que les couleurs du spectre solaire sont toutes représentées; en effet, les teintes vertes, jaunes et rouges sont très communes de même que le violet, le brun et le noir. Pour ce qui est de l'état d'agrégation de ces substances chromogènes, on distingue l'état liquide, l'état granuleux ou cristallin. C'est Pouchet (48)

qui, guidé à la fois par la teinte et par l'état de ces corps, a essayé d'établir une classification rationnelle sur ces données. Cet auteur distingue trois séries de pigments :

1° la série comprenant les couleurs noires et brunes;

2° celle appelée xanthique renfermant des colorants rouges ou jaunes (ces deux séries se trouvent surtout à l'état grenu);

3° la série cyanique (bleue ou violette) à l'état dissous.

Certains chercheurs ont envisagé les couleurs d'absorption et les couleurs de reflexion. Mais, comme le dit à juste titre VERNE (49), tous ces essais ne sont que des tâtonnements, tous ces caractères n'ont qu'une valeur secondaire; l'analyse d'un pigment doit être plus pénétrante et l'on doit avant tout rechercher sa nature, tenter son isolement, se demander quelle est sa constitution, son origine, son mode de formation, sa fonction physiologique. Pour répondre à toutes ces questions, il n'y a qu'un moyen : effectuer l'analyse chimique; c'est donc la classification chimique des matières pigmentaires, qui est appelée à rendre le plus de services dans cette voie.

Nous exposerons ici la classification chimique des pigments donnée par VERNE (49) qui constitue, nous le pensons, une synthèse très bien adaptée à nos connaissances actuelles. Elle comprend neuf séries de matières colorantes :

1° *Série terpénique :* hydrocarbures et pigments dérivés; *Carotinoïdes :*

Ce sont les plus simples des pigments; formés de carbone et d'hydrogène. Leur type est donné par le carotène végétal : $C^{40} H^{56}$, dont le *lycopène* est un isomère. On leur rattache un certain nombre de pigments comprenant outre les deux corps simples précédents, de l'oxygène; ces deux types forment le groupement de *carotinoïdes* dont la couleur varie du jaune au rouge. Ces corps ne sont pas solubles dans l'eau, mais dans les lipides et leurs solvants; la solubilité dans l'alcool est peu accusée. Ces substances peuvent s'unir aux matières protéiques et donnent par combinaison chimique les carotiprotides, qui sont solubles dans l'eau et dont la couleur va du rouge au brun et du bleu au violet noir.

2° *Pigments ternaires non azotés rattachés à des séries de carbures aromatiques ; anthraquinones :*

La plupart des pigments de ce groupe peuvent être rattachés à l'*antraquinone*, qui résulte de l'oxydation de l'anthracène. Ces corps sont teintés en jaune ou en rouge; ils ne sont pas solubles dans l'eau, sont faiblement solubles, quelquefois même insolubles dans l'alcool et ont la propriété de se combiner avec certains sels. Les pigments du groupe anthraquinonique se trouvent surtout chez les végétaux : acide chrysophanique, alizarine, alcaline. On leur rattache également certains pigments d'origine animale comme l'acide carminique, le kermès et l'acide laccaïnique. Des pigments secondaires végétaux peuvent aussi trouver leur place dans cette série : par exemple l'acide vulpinique qui contient le radical toluène.

3° *Groupe de la pyrone :*

On peut grouper dans cette série trois familles de pigments qui sont exclusivement végétaux : ce sont les *oxyxanthones*, les *oxyflavones* et les *anthocyanines*, dont la teinte varie du bleu au rouge. Tous ces corps sont solubles dans l'eau ; ils existent la plupart du temps sous forme de glucosides; leur importance est très grande et leur nombre immense.

4° *Pigments lipidiques :*

Ces corps se forment par auto-oxydation lente de différents *lipides ;* la couleur est jaune, brune ou noire selon le processus. On les appelle des *chromolipoïdes ;* jusqu'à présent on ne les a trouvés que chez les animaux. Ils peuvent contenir de l'azote.

5° *Série indolique :*

Le phéno-pyrrol ou *indol* est leur noyau constitutif : ces pigments sont végétaux ou animaux; la couleur est généralement bleue; ils sont insolubles dans l'eau et l'alcool; solubles dans le chloroforme. Le type est l'*indigo*.

6° *Groupe du tétrapyrrol :*

Le noyau ici est caractérisé par l'association de quatre molécules de *pyrrols*, c'est pour cette raison qu'on l'appelle noyau tétrapyrrolique : pas mal de pigments végétaux et animaux entrent dans cette catégorie. Ce noyau se retrouve dans les *porphyrines ;* l'adjonction de radicaux métalliques,

l'association avec des protides peuvent donner à ces corps une grande complexité; les principaux pigments de ce groupe sont, au point de vue végétal : la chlorophylle et chez les animaux : l'*hémoglobine.*

7° *Pigments protéiques* :

Chez ces substances souvent le caractère pigmentaire est lié à la présence d'un groupement prosthétique coloré dont l'individualité pigmentaire est propre. Mais ces composés, parmi lesquels on peut citer les carotiprotéides, se rattachent à des groupements étudiés.

Dans certains cas en dehors du corps protéique, le groupement chromogène ne possède pas d'existence pigmentaire individuelle. Dans l'*hémocyanine*, dans l'*hémérythrine*, le protide est coloré en vertu de la présence d'un métal. Il existe aussi des pigments protéiques dont le radical coloré n'est pas connu en dehors de cette combinaison. Nous pouvons citer ici la *phyco-érythrine* et la *phycocyanine*, pigments rouges et bleus des algues: on a rapproché de ces deux substances la *fabréine* et la *stentorine* trouvées chez des protozoaires.

8° *Pigments de désintégration des protéiques* :

Quand elles se désintègrent, les matières protéiques engendrent des composés qui peuvent être directement colorés ou qui par oxydation peuvent donner des pigments. Ces corps ne paraissent se former que chez des animaux. On y trouve des uranidines, l'urochrome, les mélanines, dont la constitution est complexe; la couleur vraie du jeune au brun et au noir.

9° *Pigments de désintégration des nucléines :*

Tout comme les matières protéiques les nucléines endogènes ou exogènes produisent par dislocation des composés capables d'engendrer des couleurs exclusivement animales : les pigments puriques, dont la coloration est jaune ou blanche ces matières se trouvent souvent à l'état cristallisé.

Nous étudierons chacun de ces groupes de pigments en insistant particulièrement sur ceux qui semblent jouer un rôle primordial chez les végétaux :

Les carotinoïdes :

En 1911, O. Schimon (50) publie un travail très documenté sur la question et il s'exprime ainsi : « la présence de *carotines* n'est pas seulement limitée aux organes jaunes et rouges, on les trouve aussi dans les parties vertes où ils font partie des chloroplastes végétaux ». La substance chromogène qui fut isolée et étudiée la première dans ce groupe, est la matière colorante retirée de la carotte; Wackenroder (51) la mentionne déjà en 1826. Elle a fait l'objet d'analyses, plus tard, par Vauquelin (28) et Bouchardat (52) et aussi par Zeise (53). Cet auteur a donné la formule suivante $(C^{5} H^{8})$ 10. Husemann (54) a par contre pu trouver dans son produit 6 % d'oxygène; il a donné la formule : $C^{18} H^{24} O$. Arnaud (55) a démontré qu'il s'agissait d'un hydrate de carbone très facilement oxydable er il a proposé la formule : $C^{26} H^{38}$. Cependant la constitution définitive de cette substance a été trouvée par Willstætter et Mieg (56) comme étant $C^{40} H^{56}$; les auteurs lui ont donné le nom de *carotène*; elle fournit un produit d'addition : $C^{40} H^{56} I^{2}$. Les réactions d'identification de la carotine sont les suivantes :

1° Au moyen de la carotine cristallisée ou par le contact de substances carotinigènes en présence d'acide sulfurique concentré ou d'acide azotique, on obtient une coloration foncée bleue ou indigo qui, par une action prolongée, passe du violet ou jaune foncé.

2° La carotine mise en présence d'acide chlorhydrique avec addition de phénol ou de thymol donne une coloration bleue foncée.

3° En ajoutant à une solution de carotine un liquide iodo-ioduré, il apparaît une teinte verte.

4° Les carotines, sous l'action de l'acide sulfhydrique gazeux, passent au bleu indigo. Le même réactif employé à l'état liquide donne une teinte brun, couleur de café. Dans les deux cas, si on ajoute de la potasse on revient à la teinte rouge.

5° Le chlore produit avec la carotine un dérivé de substitution, la carotine tétra-chlorée, poudre blanche amorphe obtenue en faisant passer un courant sec de gaz

chloré sur la carotine et en précipitant la solution alcoolique ainsi obtenue au moyen d'eau. Le carotène tétrachloré à l'état pur, se colore en rouge par chauffage à 100°; son point de fusion est de 120°. Une solution alcoolique de carotène fournit les trois bandes d'absorption suivantes (d'après Tschirsch (57)).

1° λ = 468 à λ = 485
2° λ = 438 à λ = 455
3° λ = 418 à λ = 430

D'après Kohl (58) dans une solution éthérée ces trois bandes ont la situation suivante :

1° λ = 490 à λ = 495
2° λ = 455 à λ = 445
3° λ = 430 à λ = 418

D'après Dhéré et Ryncki (59) les pigments carotinoïdes (carotine et xanthophyle) présentent une transparence relative considérable pour toutes les radiations ultraviolettes jusqu'au voisinage de λ = 225.

La carotine du *Daucus* en solution chloroformique à la température de + 15° fait subir à la lumière polarisée une déviation à gauche = — 30°,17. Les recherches concernant la constitution des différents pigments des champignons du groupe de la carotine est considérable, mais notons ici que jusqu'à présent très peu de ces pigments ont été examinés rigoureusement par l'analyse chimique et physique; il est par conséquent en l'état actuel des choses pour ainsi dire impossible de classer ces corps d'après leur constitution. On trouvera à ce sujet les meilleurs travaux dans les mémoires de Zopf (60) et de Nadson (61).

A l'état pur, on peut obtenir les carotinoïdes sous la forme de cristaux dont la couleur varie du jaune foncé au rouge grenat. Lippmaa distingue les carotines jaunes ou xanthocarotinoïdes des carotines rouges ou hématocarotinoïdes. Les cristaux présentent la plupart du temps des reflets mordorés. Leur point de fusion est situé entre 167° et 170°. Ces substances sont peu solubles dans l'alcool, solubles dans l'acétone, la benzine, l'éther, le chloroforme; le solvant

de choix, semble être le sulfure de carbone. Les carotinoïdes peuvent également se dissoudre dans les lipides; d'ailleurs les différentes solubilités dans ces liquides sont utilisées pour la classification de ces matières chromogènes. Les teintes élémentaires sont les suivantes : jaune dans la benzine, rouge carmin dans le sulfure de carbone.

La préparation des carotinoïdes et leur isolement constituent une opération très délicate vu leur grand degré d'altérabilité : on arrive cependant à les séparer grâce à leur solubilité différente dans les solvants organiques et aussi en utilisant la saponification des corps gras. Pour l'étude spectroscopique Dhéré a indiqué une méthode intéressante basée sur l'absorption inégale des carotinoïdes par une colonne de carbonate de calcium sec en poudre.

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, on peut distinguer des substances composées uniquement de carbone et d'oxygène et d'autres matières en différant par la présence dans leur molécule d'une certaine proportion d'oxygène. En ce qui concerne les *hydrocarbures*, le type est la *carotène*, qui se distingue des autres carotinoïdes par sa solubilité très grande dans le sulfure de carbone et sa non-solubilité dans l'alcool; de plus, ce corps n'est pas absorbé par le carbonate de calcium; son spectre présente deux bandes d'absorption.

Parmi les *carotines* oxygénées, on trouve des corps très oxydables qui se distinguent du carotène et de ses voisins immédiats par la solubilité plus grande dans l'alcool; de plus les solutions de ces corps sont absorbées par le carbonate de calcium. Les bandes du spectre sont aussi au nombre de deux, mais déplacées légèrement vers le violet par rapport à celles du carotène. Ce sont essentiellement les corps appelés *xanthophylles*, qui sont jaunes; cependant il existe des isomères rouges de ces substances.

Ces substances se trouvent dans les feuilles, les fleurs, les fruits des phanérogames, dans les algues (fucoxanthine, carotène et xanthophylles). Chez les champignons, nous pouvons citer les couleurs des *Urédinées*, qui sont dues à ces pigments, les algues *Diatomées* renferment une forte proportion de carotine; en ce qui concerne les carotinoïdes signalées chez les champignons inférieurs et surtout chez les Levures,

on ne connaît pas exactement leur nature. Pour les bactéries nous pouvons nous reporter aux travaux de Zopf qui a décrit ces pigments chez huit microorganismes bactériens où ils forment des pigments jaunes ou rouges. La *bactériopurpurine* n'est autre chose qu'un carotinoïde différent du carotène et des xanthophylles; la différenciation entre ces différents corps est surtout possible par la nature et la place des bandes d'absorption. Rappelons les travaux de Molisch (62), qui a extrait deux bactériopurpurines de deux bactéries différentes.

Les carotinoïdes sont élaborés par les cellules végétales; aucun doute n'est plus permis sur ce point depuis les beaux travaux de Guilliermond (63) et de son école qui ont prouvé l'origine intra-cellulaire de ces pigments et le rôle des mitochondries dans leur production.

Pigments anthraquinoniques :

On compte un certain nombre de couleurs animales et végétales ayant la constitution de composés *anthraquinoniques;* on peut citer par exemple en ce qui concerne les végétaux l'*alizarine*, l'*alcannine*, l'*acide chrysophanique ;* chez les animaux on connaît le kermès et le carmin.

Chez le *Rubiacées* on a pu déterminer la présence d'*alizarine* à l'état de glucoside : c'est une dioxy-anthraquinone. La *purpurine* qui l'accompagne généralement est une trioxy-anthraquinone. L'alcannine a été retirée de la racine de l'*Alkanna (Borraginées);* des pigments très voisins sont contenus dans certaines cellules d'*Echium*, de *Lithospermum*, d'autres *Borraginées*. L'*alcannine* a la propriété de se dissoudre dans les huiles grasses; sa constitution n'est encore pas, de nos jours, entièrement connue; on sait cependant que par oxydation elle produit de l'anthraquinone et des dérivés méthylés de ces corps.

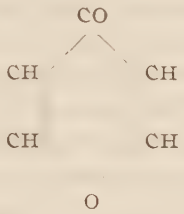
L'acide chrysophanique a été retiré de la rhubarbe; il existe chez de nombreux végétaux sous forme de glucosides *(Cassia, Rumex, Rhamnus);* cette matière colorante produit une teinte jaune; elle est peu soluble dans l'eau et dans l'alcool, facilement dans le benzol; au point de vue constitution chimique c'est un dioxy-méthylanthraquinone.

Citons encore ici dans ce groupe les *anthraglucosides* à propriétés purgatives, tels que la *franguline*, la *glucosénnine*, l'*alöine*.

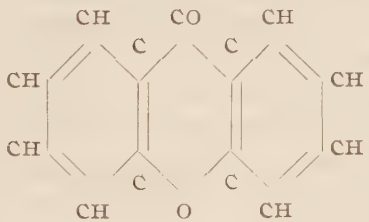
Série des oxyflavones, oxyxanthones et anthocyanes :

Ces pigments sont pour la plupart les matières colorantes qui donnent aux fleurs leurs couleurs vives et aux feuilles leurs colorations spéciales en automne. Leur étude a été fort difficile; après bien des recherches patientes on est arrivé à leur attribuer un noyau pyronique.

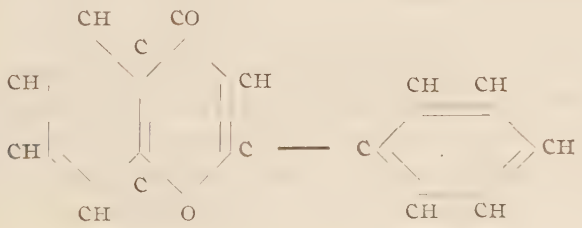
La pyrone est un composé hétérocyclique de formule :



Les oxyxanthones et les oxyflavones sont des matières colorantes jaunes. Les premières dérivent de la substitution d'oxhydriles phénoliques à un certain nombre d'atomes d'oxygène de la xanthone qui est une diphénopyrone dont nous donnons ci-dessous la formule



Nous voyons ici un noyau pyronique soudé à deux noyaux benzéniques. Les derniers sont formés par la substitution d'oxhydriles phénoliques à un certain nombre d'atomes d'oxygène de la flavone :



La flavone comprend un noyau grolique soudé d'une part à un noyau benzénique et lié d'autre part par substitution d'un atome d'hydrogène. Parmi les oxyxanthones nous citerons la *cotöine*, l'*euxanthone*, la *maclaurine*, la *diatiscétine* et la *gentiséine*.

Le nombre des oxyflavones est beaucoup plus considérable : la *lutéoline*, du *réséda*, la *quercétine* sont les plus connues.

Les anthocyanines sont très voisins des oxyxanthones et des oxyflavones mais présentent cependant une différence essentielle : la coloration; ce sont en effet des substances rouges, bleues, violettes. Elles sont solubles dans l'eau, ce qui facilite leur extraction; avec les acides elles donnent une teinte rouge; avec les alcalins une coloration verte. On peut les trouver dans les fleurs, les fruits et les feuilles.

D'après Overton (64) dans les végétaux l'apparition de la coloration rouge anthocyanique semble être liée à un accroissement de la quantité des sucres contenus dans les végétaux. Combes (65) a pu vérifier que la production d'anthocyane correspond bien à une accumulation des sucres et des glucosides et à une diminution de la proportion des dextrines. La formation du pigment se montre favorisée par l'exposition à la lumière et par le contact des tissus avec une solution de saccharose. L'abaissement de la température qui provoque la transformation de l'amidon en sucre semble être un phénomène primordial dans l'apparition de la teinte rouge des feuilles en automne. D'après un grand nombre de chercheurs, le rougissement serait corrélatif de la présence d'oxygène et de l'augmentation de l'intensité des phénomènes respiratoires. Combes, cependant, a pu montrer synthétiquement que l'anthocyane provenant des feuilles rouges prend naissance lorsque le composé correspondant, contenu dans les feuilles vertes, est soumis à des actions réductrices. Le même auteur a pu prouver que le pigment jaune élaboré par les feuilles vertes de vigne vierge, pendant la période active de végétation, pouvait être produit expérimentalement en dehors de l'organisme par l'oxydation du pigment rouge des feuilles d'automne. Willstætter (66 et 67) et ses élèves ont extrait les colorants et les ont obtenus à l'état de pureté : les auteurs ont proposé pour ces corps les noms de *cyanines* ou anthocyanines; ils appellent leurs produits de dédouble-

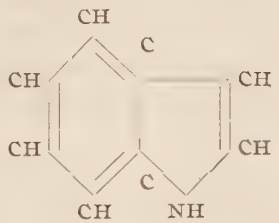
ment *cyanidines* ou *anthocyanidines*. Les anthocyanines donnent lieu à une réaction très intéressante qui permet de distinguer la substance glucosidique initiale de ces composants prenant naissance par séparation du glucose. Cette réaction appelée réaction d'ERDMANN (68) repose sur le partage des *anthocyanines* et des *anthocyanidines* entre l'eau acidulée et l'alcool amylique. Les premières demeurent dans la couche aqueuse; les secondes passent totalement dans l'alcool amylique. Il existe un grand nombre d'anthocyanines qui se distinguent par leur teinte initiale, leur solubilité et la réaction en présence de perchlorure de fer.

Parmi les recherches effectuées sur les bactéries et concernant des pigments anthocyaniques, nous relaterons ici celles de REINER-MÜLLER (69) sur le *Bacterium coelicolor* et le travail de SEVENET (70) sur le *Bacillus citrulli Sartoryi ;* cet auteur, en effet, a pu isoler à l'état pur et cristallisé un pigment possédant les propriétés des glucosides et se dédoublant en donnant naissance à une anthocyanidine identique à la *pélargonidine.*

Pigments de la série indolique :

Le type de ces pigments est donné par l'*indigo,* matière colorante que l'on extrait des feuilles de l'indigotier *(indigofera tinctoria)* et de l'*Isatis tinctoria;* c'est une substance de teinte bleue que l'on connaît bien de nos jours et qui a pu être reproduite par synthèse.

L'*indol* ou *phénopyrrol* se trouve à la base de la constitution de cette matière chromogène :



Pour former l'indigo, deux molécules d'indol se réunissent, avec fixation d'oxygène. La matière colorante peut être obtenue cristallisée; elle est dans ce cas bleu foncé, les reflets sont cuivrés. L'eau, l'alcool, les acides et les bases étendus

ne la dissolvent pas; par contre elle est soluble dans le chloroforme, l'aniline, la paraffine. L'indican n'est autre chose qu'une combinaison de l'indigo avec un glucoside.

Pigments tétrapyrroliques :

Les substances colorantes appartenant à ce groupe sont constituées par l'association de quatre groupements pyrroliques : le mieux étudié est l'hémopyrrol : le premier groupe comprend des pigments qui sont communs aux animaux et aux végétaux : *porphyrines, hématine, cytochrome.*

Un deuxième groupe comprend la *chlorophylle,* pigment végétal par excellence qui ne s'observe qu'exceptionnellement chez les animaux.

Le troisième comprend des *hémoglobines* rudimentaires ou ancestrales et l'hémoglobine vraie. Nous n'insisterons pas davantage sur les pigments de cette série étant donné leur absence constante chez les organismes qui nous occupent.

Phycochromoprotides :

Ce sont des colorants des algues; ils existent dans les chromatophores à côté de la chlorophylle et des carotinoïdes; on les a observés chez les *Floridées* et les *Cyanophycées ;* ce sont des substances colorantes individualisées solubles dans l'eau.

Nous citerons ici le *phycoérythrine,* pigment rouge, la *phycocyanine,* de couleur bleue-violette. L'eau renfermant des traces de sels neutres, les dissout et la solution présente une fluorescence nette; ils sont précipités de leurs solutions aqueuses par les acides étendus, le sulfate de magnésium à saturation et le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation ont la même action. Les solutions aqueuses sont coagulées sous l'action de la chaleur.

Pigments bactériens :

Pour terminer cette première partie, qu'il nous soit permis de dire un mot sur les pigments bactériens, substances colorantes bien particulières et dont la constitution chimique est loin d'être connue. La plupart sont des composés azotés

que l'on a réussi, du moins pour quelques-uns, à obtenir à l'état cristallisé : on les identifie par leurs caractères de solubilité et par leurs spectres d'absorption. Nous nous en voudrions ici de ne pas citer les belles recherches patientes et détaillées de LASSEUR et GIRARDET (71) . La *pyocyanine* est un pigment spécifique produit par le *Bacillus pyocyneus ;* cet organisme est capable d'élaborer quatre pigments : un bleu, un rouge, un rouge brun, un fluorescent. La *pyocyanine* cristallise facilement ; elle est soluble dans le chloroforme, s'altère facilement à l'air. Dans le spectre deux bandes d'absorption sont visibles.

Le *Bacillus chlororaphis* a la propriété de produire dans les milieux de culture une matière colorante, la *chlororaphine,* qui se présente sous forme de belles aiguilles vertes ; par oxydation, cette substance donne naissance à l'oxychlororaphine jaune qui, par réduction redonne des solutions vertes.

Citons ici les *violacéines* dérivant de nombreuses bactéries: la bactérie la mieux connue et qui possède la propriété de produire cette matière colorante est le *Bacillus violaceus.* Les *violacéines* se dissolvent dans l'alcool, l'éther, l'acétone ; elles sont insolubles dans la benzine et le sulfure de carbone.

La *prodigiosine* est un pigment que l'on a extrait du *Bacillus prodigiosus* : cette matière colorante est brun rougeâtre ; elles est soluble dans l'alcool à 80° et donne une solution rouge. Malgré tous leurs efforts, LASSEUR et GIRARDET n'ont pas réussi à faire cristalliser la *prodigiosine* et ces auteurs ont effectué leurs recherches au moyen du colorant purifié et obtenu par extraction alcoolique et éthérée. La substance brun-rougeâtre, offrant les reflets métalliques, lorsqu'elle est en suspension dans l'eau, est purifiée par l'analyse capillaire. C'est WREDE et son école (72) qui ont isolé ce pigment à l'état cristallin, ainsi que la pyocyanine du *Bacillus pyocyaneus.*

Nous avons ainsi terminé l'exposé sur les principaux pigments pouvant se trouver chez les végétaux ; nous croyons avoir rapporté l'essentiel de ce qui a été dit sur ce sujet. Nous aborderons dès maintenant notre seconde partie où il est question de nos recherches personnelles.

DEUXIEME PARTIE

Recherches personnelles

Avant de décrire les deux levures qui font l'objet de cette étude, nous nous permettrons de rappeler ici les caractères essentiels d'un *Cryptococcus* décrit par notre cher maître le professeur A. SARTORY en 1907; il s'agit ici aussi d'une espèce chromogène à pigment rose (73).

L'auteur l'a isolé avec l'*Oidium lactis* dans divers échantillons de sucs gastriques hyperacides provenant du service du docteur OETTINGER de l'*Hôpital Broussais à Paris*. Sur dix-sept de ces sucs, treize donnent des cultures de cette levure; elle est voisine au point de vue aspect général du *Saccharomyces roseus*, d'un beau rose foncé pouvant aller jusqu'au rouge ponceau. Les cellules ont une forme sphérique de 6 à 8 μ de dimensions moyennes. L'optimum cultural est compris entre + 22° et + 25°. La levure se développe néanmoins à + 15° et jusqu'à + 34°. Dans ce dernier cas, la couleur va en s'affaiblissant jusqu'à + 39°. Entre + 40° et + 41° la levure cesse de végéter.

Elle donne un voile rose sur le bouillon pepto-glycériné, à une température comprise entre + 15° et + 38°. La température la plus favorable à la formation du voile se trouve comprise entre + 26° et + 28°. En vieillissant, les cellules du voile s'allongent en forme de boudin. Le dépôt du fond est constitué uniquement par des cellules sphériques.

Le *Cryptococcus salmoneus* se cultive bien sur tous les milieux solides : gélatine, gélose, liquide de RAULIN gélatiné, pomme de terre et surtout sur carotte. Cette espèce se développe également sur milieu de RAULIN, galactosé ou maltosé.

Le pigment est soluble dans le sulfure de carbone, la benzine, le chloroforme, l'alcool éthylique, l'éther, l'acétone et insoluble dans l'alcool méthylique. La levure secrète de l'invertine, mais ne produit pas de fermentation alcoolique. Elle est sans action sur les dextrose, maltose, galactose, amidon et inuline. Elle précipite la caséine au bout de 18 jours, mais sans dissoudre le précipité. Elle n'est pas pathogène pour le cobaye, le lapin et le chien.

La même levure a été retrouvée par BEAUVERIE dans une ulcération linguale chez un malade atteint de fièvre typhoïde (BEAUVERIE et LESIEUR).

CHAPITRE Ier

Etude morphologique et biologique du Cryptococcus corallinus

Ses caractères culturaux et biochimiques

1° *Origine :*

Cette levure a été isolée pour la première fois dans le laboratoire du professeur A. SARTORY (74) à partir de matériel pathologique provenant du service du docteur HUFSCHMITT, médecin de l'hôpital du *Hasenrain à Mulhouse.* Le malade présentait des lésions rappelant la disposition et la structure des kérions trichophytiques.

Des prélèvements de cheveux furent effectués; au laboratoire on les débita en petites portions dont les unes furent ensemencées sur des milieux acides, les autres sur des substrats alcalins.

Parmi les nombreux milieux ensemencés et disposés à des températures différentes, ce n'est que sur gélose de SABOURAUD glucosée et à + 37° que nous avons pu obtenir des cultures de cette espèce en partant des poils parasités.

Nous exposerons par la suite nos recherches relatives à l'action pathogène expérimentale de cet organisme sur les différents animaux utilisés au laboratoire.

2° *Examen microscopique de cultures en goutte pendante :*

Afin d'être fixé aussi bien que possible sur la morphologie de la levure étudiée, nous avons effectué des cultures en chambre de VAN TIEGHEM : celle-ci est composée d'un anneau de verre collé par du baume de Canada sur une lame de verre (porte-objet). A l'intérieur de la petite cellule, on place une goutte d'eau pour maintenir l'atmosphère de la

chambre suffisamment humide; puis on recouvre celle-ci au moyen d'une lamelle couvre-objet sur laquelle on a déposé au préalable une goutte de milieu nutritif ensemencé au moyen d'une petite quantité de la levure à étudier. On maintient la lamelle adhérente sur l'anneau de verre au moyen d'un lutage à la vaseline. Le milieu de culture que nous avons adopté a été le moût de bière; dans ces conditions, à la température de + 18°, nous avons pu constater après 48 heures un début de croissance; l'examen microscopique nous a montré des cellules levures rondes, dans certains cas ovoïdes, bourgeonnantes de 2 μ à 2 μ 20 zur 3 μ à 3 μ 50. Les cellules ne bourgeonnent généralement qu'à une seule de leurs extrémités, donnant naissance à des éléments qui s'individualisent. Jamais dans ces cultures nous n'avons pu mettre en évidence des formes ascosporées.

3° *Colorations :*

Afin d'établir avec certitude les données que nous avions constatées dans les cultures en cellule et dans les préparations à l'état frais, nous avons eu recours à des méthodes spéciales : nous citerons tout d'abord la méthode au rouge neutre préconisée par Guilliermond. Cette coloration s'opère sur les cellules vivantes : c'est donc une coloration vitale; en effet à une certaine concentration le *rouge neutre* peut colorer les cellules-levures sans les altérer. Pour cela, nous avons disposé une petite quantité d'une culture de notre levure dans une goutte de solution aqueuse de rouge neutre à 1 pour 10.000. Dans ces conditions, le protoplasme et le noyau restent incolores et seules les parties en voie de dégénérescence, c'est-à-dire les moins vivantes fixent le colorant : c'est le cas des vacuoles et des corpuscules métachromatiques : dans ces conditions les préparations effectuées nous ont montré une membrane à double contour et un protoplasme tous deux non colorés : dans certains individus : présence d'une vacuole assez importante; ainsi que de corpuscules métachromatiques; les cellules jeunes ne contiennent pas de vacuole.

Des préparations ont été traitées au moyen de sudan III (coloration vitale); ici encore la membrane et le proto-

plasme ne nous ont pas paru colorés; le protoplasme renferme en son intérieur quelques globules de graisses en nombre variable selon les cellules.

Afin de rechercher la présence des spores, on a eu recours aux méthodes spécifiques indiquées à cet effet par SASAKAWA (75) d'une part et par SCHUMACHER (76), de l'autre : nous donnerons ci-dessous ces deux techniques.

La méthode employée par SASAKAWA consiste dans l'emploi de la méthode de HEIDENHAIN à l'hématoxyline au fer (la technique est d'ailleurs indiquée dans le traité de GUILLIERMOND) à propos de l'examen cytologique des noyaux. Le même auteur emploie pour la mise en évidence des spores la méthode de MOELLER : la préparation fixée est immergée pendant 10 secondes à 5 minutes dans de l'acide sulfurique à 1 %. On lave à l'eau, on colore avec de la fuchsine phéniquée en chauffant pendant 1 minute. On différencie par l'acide sulfurique à 5 % pendant cinq secondes; on lave, on contre-colore au moyen de bleu de méthylène aqueux pendant environ 3 minutes; à ce moment on lave, on sèche et on peut examiner.

Afin d'éviter des confusions possibles, nous avons pris la précaution de traiter les préparations fixées pendant deux minutes encore par le chloroforme, pour éliminer au maximum les gouttes de graisse.

Nous avons fait usage également de la méthode de SCHUMACHER recommandée par BUSCHKE et HARRY (77) dans leur magistrale étude sur les levures. Elle consiste à fixer tout d'abord les préparations par la chaleur; on colore ensuite pendant une minute avec une solution phéniquée à 1 % de bleu de méthylène; on lave à l'eau distillée et on colore pendant une minute et demie en agitant constamment au moyen d'une solution à 1 % de *phosphine* (di-amido-phényl-acridine); les éléments acido-résistants que SCHUMACHER, BUSCHKE et HARRY prennent pour de la *volutine* sont teintés par cette méthode en vert; la nucléine se colore en jaune et les spores prennent une teinte bleue. Nous avons ainsi par ces différentes méthodes obtenu des résultats absolument concordants : jamais dans nos différentes préparations nous n'avons mis en évidence des formations

d'asques ou d'ascospores. Nous reviendrons sur ce point par la suite lorsque nous exposerons les différentes tentatives opérées en vue de faire produire à notre organisme sur des milieux spéciaux des formations sexuées.

4° *Caractères culturaux* :

Des ensemencements ont été pratiqués à partir des cultures initiales provenant des lésions, sur divers milieux solides : milieu de SABOURAUD, maltosé et glucosé, pomme de terre, carotte, jus de pomme de terre gélatiné, gélatine, albumine d'œuf, banane, pomme de terre glycérinée. (Fig. 5)

Les milieux liquides ont été les suivants : bouillon de viande, bouillon glycériné, liquide de RAULIN neutre, acide, glucosé, eau de malt, moût de bière. Les cultures ont été placées à des températures comprises entre + 25° et + 28° qui réalisent pour l'espèce considérée, comme nous le verrons plus loin, l'optimum cultural. Toutefois nous donnerons ici les caractères culturaux de notre *Cryptococcus*, lors des premiers ensemencements sur milieu de SABOURAUD à partir des poils.

Culture sur milieu de Sabouraud : Sur ce substrat, à la température de + 37°, dans les premières quarante-huit heures, nous ne voyons apparaître aucune végétation; ce n'est que le troisième jour que l'on perçoit une première phase évolutive de la culture; il se produit en effet à cette période autour des fragments de poils disposés sur le milieu de culture solide des formations de couleur blanche, revêtant l'aspect de sorte de gaines à contours nettement limités, la teinte est d'un blanc crème, la levure ne tarde pas à prendre un aspect lisse et visqueux caractéristique de beaucoup de levures.

Par la suite la culture continue a évoluer dans un sens favorable et nous pouvons constater au bout de quatre ou cinq jours la formation d'un tapis humide, glaireux, qui se développe peu à peu en envahissant tout le substrat contenu dans le tube de culture; au point de vue coloration nous ne constatons pas de modification sensible par la suite; la teinte blanc-crème est persistante sur ce milieu et à la température de + 37°. Toutefois, le voile formé ne tarde pas à perdre son aspect lisse et uni; il se plisse bientôt, se déssèche et prend

une forme ridée et vallonnée. Ces cultures abandonnées à + 37° conservent invariablement tous les caractères que nous venons d'énumérer, mais si on les soustrait à la température de + 37° et qu'on vient à les placer à + 27°, même après huit à dix jours de séjour à la première température, la teinte blanc-crème ne persiste pas; elle se modifie assez rapidement, vire au rose très tôt et nous avons même pu constater dans certaines cultures abandonnées une trentaine de jours à + 27° que cette couleur peut foncer jusqu'à devenir saumon.

Si on dispose immédiatement à + 27° les tubes de culture qui viennent d'être ensemencés au moyen de levures cultivées à + 37°, on constate que le deuxième jour le champignon se développe d'une façon très satisfaisante en donnant sur le substrat de petites colonies roses, punctiformes; la coloration s'accentue de plus en plus pour arriver au rouge saumon ou rouge corail. Les colonies qui se sont formées au niveau des régions d'ensemencement se développent suivant une direction centrifuge; au commencement elles offrent peu de tendance à confluer : elles prennent un aspect bien lisse, visqueux, rose; deux ou trois jours plus tard il se forme un tapis bien homogène par suite de la réunion des différentes colonies; ce tapis ne tarde pas à recouvrir entièrement tout le substrat. A partir du cinquième jour la culture se plisse, figurant assez bien en certains points des sortes d'anses intestinales; cet aspect est tout à fait caractéristique. (Fig. 3) Pris d'un doute, nous avons effectué de nombreuses vérifications pour nous rassurer sur la pureté de notre culture; celle-ci nous a été démontrée par nos examens microscopiques. Le septième jour la teinte continue à se foncer; à partir du neuvième jour l'aspect et la coloration ne changent plus, le plissement s'arrête. La teinte est toujours saumonée mais la croissance de notre microorganisme semble cesser à cette période. L'examen microscopique nous montre des cellules levures ovoïdes ou rondes bourgeonnant dans certains cas; ces éléments présentent les dimensions suivantes : 1 μ 50 à 2 μ 50 pour les éléments sphériques; pour les formes ovoïdes : 1 μ 25 à 1 μ 50 sur 2 μ 50 à 3 μ. (Fig. 1)

Milieu de pomme de terre : A la température de + 37° la levure végète assez bien dans les premières heures; la

culture est d'une teinte blanche, tendant légèrement vers le blanc crème; les troisième et quatrième jours, l'organisme se développe sur la pomme de terre où elle forme un enduit lisse, visqueux, dont la coloration passe au jaune sale. Cette teinte s'accentue par la suite. La poussée se manifeste avec le plus d'intensité vers le fond du tube, dans les régions les mieux favorisées par l'humidité; dans la partie supérieure du milieu végétal où nous avions disposé intentionnellement une petite quantité de levure, nous constatons que cette dernière a végété très faiblement, ne s'est pas étalée; elle a donné un léger revêtement à aspect plâtreux blanc, puis légèrement rosé. L'examen microscopique des prélèvements que nous avons effectués à ce niveau nous a montré des cellules bourgeonnantes, rondes la plupart du temps, différentes de celles qui vivent en profondeur en ce sens : que leur volume a changé; elles sont hyperthrophiées, d'une grandeur atteignant environ le double des élements cellulaires végétant dans de bonnes conditions. Leur diamètre va jusqu'à 5μ; elles présentent une double membrane particulièrement nette; le protoplasme n'est pas normal; il semble avoir subi une forte concentration; quelques préparations de ces cellules ont été effectuées et colorées au moyen du bleu lactique; par cette méthode le protoplasme se colore bien, les cellules levures sont souvent solitaires; cependant dans quelques cas elles sont associées par trois, quatre ou cinq. Elles sont ordinairement sphériques, rarement ovalaires ou piriformes. Cet aspect a été rencontré par nous dans tous les milieux peu favorables à notre levure, lorsqu'elle souffre. Après dix jours de culture sur pomme de terre, l'enduit formé sur le milieu est toujours jaune sale. Des divers examens que nous avons pu effectuer, nous concluons que ce milieu n'est pas favorable pour l'organisme en expérience, ceci tout au moins à la température de + 37 °.

Les cultures effectuées sur le même milieu et disposées à l'étuve à la température de + 27 ° ont donné dès les premiers jours un développement plus satisfaisant; la coloration de début est jaune sale, puis jaune foncée tirant sur le jaune vert. A l'examen microscopique, nous rencontrons une prédominance marquée des cellules ovales sur les formes rondes très peu nombreuses. Ici donc, la pomme de terre constitue un milieu

assez favorable à la croissance du *Cryptococcus* à condition de disposer les cultures à la température de + 27°.

En ce qui concerne les autres milieux solides, nous avons pu faire les constatations suivantes : la *gélose* est un bon milieu; la carotte doit être retenue comme très favorable; la gélatine et l'albumine d'œuf ne sont pas favorables, en effet sur ces deux milieux la croissance est lente et n'aboutit qu'à la formation de petites colonies punctiformes ne se réunissant jamais pour former un tapis homogène.

Sur *banane, pomme de terre glycérinée,* la poussée est satisfaisante.

Nos ensemencements pratiqués sur les milieux liquides nous ont donné les résultats suivants :

Le liquide de Raulin, à la température de + 27° constitue un excellent milieu; en effet, après 24 heures d'ensemencement, on constate l'apparition d'un trouble et le début d'un léger voile qui se forme en surface; un dépôt commence à se former au fond du tube; trois jours après ce dépôt est coloré nettement en rouge. En ce qui concerne les cultures sur ce milieu à différentes températures, on peut tirer les conclusions suivantes : à + 18° le voile se forme en surface, mais il est très léger et très frèle, se laissant facilement déchirer; à + 22° il est plus important et résiste plus facilement ; à + 27° il a atteint son maximum de développement, il est coloré en rose et à l'examen microscopique nous remarquons dans nos préparations qu'il est constitué par des cellules rondes, fortement adhérentes les unes aux autres; à + 32° il est beaucoup moins fourni qu'à la température précédente; à + 37° il est très faible; à + 39° nous n'avons pas pu obtenir la production d'un voile dans nos cultures.

Dans le bouillon à + 27° il se forme au bout de quatre jours un très léger voile qui ne reste pas longtemps en surface; à la moindre secousse imprimée au tube le voile tombe et arrive à constituer un dépôt rosé.

Le meilleur milieu liquide est sans aucun doute le moût de bière : en effet, à + 27° , 24 heures après l'ensemencement, la formation du voile est faite et celui-ci est épais et assez résistant; en même temps il se forme en profondeur un dépôt abondant; on le voit, sur ce milieu la culture est luxuriante.

Propriétés biologiques:

L'optimum cultural a été recherché au moyen de cultures effectuées sur moût de bière et sur milieu de RAULIN et placées à différentes températures comprises entre + 10° et + 40°. Les cultures pour lesquelles nous avons remarqué la plus forte croissance et obtenu le maximum de récolte sont celles qui avaient été disposées à des températures comprises entre + 25° et + 28° A une température supérieure à + 40°, de même que à une température inférieure à + 6° on ne constate plus aucune croissance.

Pour l'étude de la *concentration optima en ions H* nous avons employé comme milieu de culture le moût de bière; on a constitué une série de tubes contenant le milieu, amené à des concentrations différentes en ions H, depuis le pH de 4 jusqu'à pH=9. Chacun de ces tubes a été ensemencé au moyen de notre levure et placé à la température de + 27°.

Les mesures ionométriques ont été effectuées au moyen du potentiomètre et de l'électrode à antimoine. Les cultures ont été examinées après 48 heures et après 4 jours; chacune des cultures a été disposée sur un filtre de *Iena*; le filtre est pesé avec précision avant et après la filtration, postérieurement à un séjour à l'étuve à + 55° jusqu'à poids constant. La meilleure récolte indique le milieu de concentration optima en ions H pour l'espèce envisagée, elle est réalisée pour pH = 6,6; les limites de l'évolution de notre champignon sont fixées comme suit : plus de croissance pour un pH limite de 7,6; plus d'évolution de l'espèce cultivée à un pH de 5,2.

En effectuant ces mesures, nous avons profité de ce que notre appareil se trouvait en service pour faire la même expérience, cette fois non plus pour fixer un pH optimum ou des pH limites de culture, mais pour fixer le pH le plus favorable à la production de notre pigment et pour déterminer les pH au delà desquels la pigmentation fait défaut. Nous reviendrons sur ce sujet dans le chapitre qui est entièrement consacré à l'étude du pigment.

Afin d'examiner l'influence de la lumière sur la croissance de la levure expérimentée nous avons disposé des milieux de culture ensemencés en des endroits diversement éclairés et nous n'avons pu constater aucune action appréciable de la

lumière sur la poussée de ces organismes même après un mois d'exposition, à condition de se tenir dans les limites de chaleur optima vues antérieurement.

Propriétés biochimiques :

Afin d'établir les propriétés biochimiques du champignon en étude, on a eu recours à des cultures effectuées sur des milieux minéraux renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral. La température de + 27° a été adoptée.

Les mêmes expériences ont été pratiquées sur des milieux renfermant des alcools polyatomiques ou des sucres.

En ce qui concerne la recherche de l'utilisation de l'azote par notre champignon, les milieux de cultures employés ont été les suivants :

1° Milieu nitraté :	Eau	1000 gr.
	Saccharose	2 gr.
	Nitrate de potasse ...	2 gr.
	Phosphate bipotassique	1 gr.
	Sulfate de magnésie ..	1 gr.
	Chlorure de sodium ..	0,5 gr.
	Phosphate de chaux ..	0,5 gr.

La poussée de la levure sur ce milieu se fait lentement; le voile à peine formé se déchire et microscopiquement nous trouvons peu d'éléments bourgeonnants et une grande quantité de cellules de souffrance.

2° Milieu ammoniacal : Le milieu ammoniacal a la même formule que le précédent avec cette variante toutefois que le nitrate de potasse a été remplacé par du sulfate d'ammonium à la dose de 1 gr.

Le voile se forme beaucoup plus rapidement (deux fois plus vite) sur ce milieu; il est résistant; en même temps il se produit dans la profondeur du milieu un dépôt assez abondant. L'examen microscopique nous permet de constater l'absence de cellules de souffrance; tous les éléments cellulaires présentent l'aspect normal et les formes bourgeonnantes sont en majorité. Par conséquent, le milieu ammoniacal est de beaucoup plus favorable à notre organisme que le milieu nitraté.

Action sur les sucres : Pour mettre en évidence les caractères de la levure en étude vis-à-vis des différents sucres, nous nous sommes adressé comme milieu de base au liquide de RAULIN dépourvu d'hydrates de carbone. Nous avons ajouté à cette solution, pour chaque cas particulier, le sucre à expérimenter.

On a employé le glucose, lévulose, galactose, mannose, saccharose, maltose et lactose. On a procédé à des ensemencements sur ces différents milieux.Les cultures ont été placées à + 27°. Pour contrôler l'assimilation des sucres par notre organisme, nous avons eu recours à la méthode de BERTRAND que nous ne décrirons pas ici étant donné qu'elle est classique.

En outre nous nous sommes adressé à la méthode indiquée par BESSON dite du tube B (BESSON, RANQUE et SENEZ) et d'un emploi très pratique.

Ce procédé est basé sur l'action réductrice du microorganisme sur le rouge neutre et les variations notables de cette propriété suivant la constitution du milieu de culture. Les sucres ajoutés en petites quantités à un milieu favorisent la réduction; si on augmente progressivement cette quantité de sucre, l'action favorisante disparaît tout d'abord, puis fait place à une action contraire.

L'expérience a été faite avec le milieu de culture que nous donnons ci-dessous :

Bouillon de viande de bœuf :	1000 cc.
Glucose	8 gr.
Solution aqueuse de rouge neutre à 1 %	3 cc.

Nous avons réparti ce milieu dans des tubes à essai larges; nous y avons introduit un tube à hémolyse renversé qui sert de cloche à fermentation. Après stérilisation le tube à hémolyse se trouve enfoncé dans le grand tube de culture et le milieu le baigne complètement. On a ensemencé et placé les cultures pendant 48 heures à l'étuve à la température de + 22 °. Cette méthode permet d'apprécier :

a) les phénomènes de réduction du rouge neutre;

b) les phénomènes d'alcalinisation et d'acidification du milieu;

c) la production ou la non-production de gaz avec le glucose et l'approximation de la quantité de gaz formés.

Les germes qui, sans réduire, acidifient, font virer la coloration vers la teinte amarante; l'alcalinisation produit au contraire une coloration rose saumon ou porto.

La réduction se traduit par une fluorescence.

Cette technique permet donc de classer le champignon étudié dans le groupe des réducteurs, dans celui des non-réducteurs, dans le groupe des germes inertes vis-à-vis des sucres ou des germes attaquant les sucres avec production ou absence de gaz.

Dans ces conditions, nous avons constaté que notre levure *réduisait le rouge neutre* (fluorescence apparaissant au bout de 4 à 6 jours de culture). Au début de la culture, il se produit une *acidification* du milieu, qui fait virer celui-ci vers la teinte amarante. L'assimilation du glucose se produit donc par l'apparition d'une acidification sans production de gaz; en effet le tube à hémolyse reste au fond du tube et le liquide nutritif remplit complètement le volume même après quatre semaines de culture.

La recherche de l'acide lactique ayant pu apparaître au cours de la dégradation des hydrates de carbone, a été effectuée après avoir débarrassé le milieu des acides volatils; nous avons concentré et filtré le substrat pour obtenir une solution limpide et non colorée. Deux parties du réactif d'Uffelmann au perchlorure de fer ont été ajoutées à une partie de ce filtrat. La présence de l'acide lactique a pu être mise en évidence par le virage de la teinte bleue violette du réactif vers le rouge violacé qui passait ensuite au jaune vert.

D'autre part nous avons agité une partie de notre milieu filtré avec de l'éther : après épuisement l'éther a été décanté et mis en présence d'acide sulfurique et d'une solution alcoolique à 5 % de codéine. Nous avons obtenu un virage vers le brun qui est caractéristique aussi de la présence de l'acide lactique.

Nous pouvons donc conclure que l'assimilation du glucose par notre organisme passe par un stade de dégradation caractérisé par la présence d'acide lactique. Aucune fermentation gazeuse, ni apparition d'alcool n'a pu être décelée.

Pour les autres hydrates de carbone nous avons utilisé la même technique et afin de contrôler l'assimilation de ces matières ternaires par notre levure, nous avons eu recours à des dosages quantitatifs par la méthode de BERTRAND effectués sur ces substances introduites dans les milieux et ceci avant l'ensemencement et après 15 jours de culture.

Dans le tableau suivant, nous exprimons les résultats obtenus au cours de ces recherches; nous notons l'assimilation par la disparition des différents sucres symbolisée par le signe + et l'importance quantitative du phénomène est exprimée par des chiffres représentant le pourcentage.

Glucose	Lévulose	Galactose	Mannose	Saccharose	Maltose	Lactose	Amidon
Ass. % + 3,8	Ass. % 0 0	Ass. % + 3,19	Ass. % + 1,78	Ass. % + 2,92	Ass. % + 2,76	Ass. % + 0,63	Ass. % +

De ce tableau nous pouvons déduire que notre organisme est incapable d'assimiler le lévulose. Le lactose constitue pour lui un milieu très médiocre ainsi que le mannose. Les glucose, galactose, saccharose, maltose sont de bons aliments ainsi que l'amidon. Sur tous ces sucres le champignon présente une fonction pigmentaire très prononcée et sensiblement équivalente.

Action sur les matières azotées : Recherches sur les propriétés protéolytiques :

Afin de rechercher les propriétés protéolytiques de notre organisme, nous avons ensemencé la levure :

1° Sur des tubes renfermant du *sérum coagulé*; la culture a été disposée à + 27°; le Cryptococcus évolue assez lentement; il donne une faible culture; après un mois aucun phénomène de liquéfaction n'a pu être constaté.

2° dans des tubes contenant du *bouillon de bœuf*, nous avons introduit des petits cubes de blanc d'œuf coagulé par la chaleur et stérilisé à l'autoclave. Le milieu a été ensemencé et placé à des températures de + 22° et de + 27°. Ici encore nous constatons la formation d'un voile assez

faible et peu résistant. Jamais nous n'avons pu mettre en évidence le phénomène de liquéfaction, ni même aucune attaque de l'albumine d'œuf.

3° *Action sur la gélatine :* Notre organisme liquéfie totalement les milieux de gélatine à la température de + 18°; au bout d'une période de 14 jours cette liquéfaction est complète.

4° Nous avons d'autre part examiné l'action de notre levure sur le *lait tournesolé*, par cultures à la température de + 18° et à celle de + 27°. A + 27° la coagulation du lait est complète le troisième jour et le coagulum n'est pas dissous; par conséquent la peptonisation de la caséine n'a pas lieu.

Cultures sur *milieux spéciaux pour favoriser la production des ascospores :* Pour étudier la possibilité de sporulation de notre organisme, nous avons fait appel à deux méthodes :

La première est appelé culture sur *blocs de plâtre :* Après avoir repiqué notre organisme à trois reprises différentes sur du moût de bière, qui, nous l'avons vu, constitue un milieu excellent et rajeunit ainsi notre espèce. Nous avons soumis le champignon à une nutrition très défavorable : nous avons employé le procédé indiqué par Engel (78) et perfectionné par Hansen (79). Nous avons ensemencé notre organisme vigoureux et rajeuni sur un bloc de plâtre obtenu en gâchant du plâtre avec de l'eau et en lui donnant une forme cylindrique au moyen d'un moule. Le bloc a été placé dans un cristallisoir, dans lequel nous avons introduit une certaine quantité d'eau distillée assez grande pour atteindre environ la moitié de la hauteur de notre bloc. Nous recouvrons le cristallisoir à l'aide d'un couvercle; puis nous avons stérilisé tout l'appareil à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes. Nous avons ensuite ensemencé notre bloc de plâtre au moyen de notre levure provenant des cultures sur moût de bière. Nous avons refermé notre cristallisoir et porté l'appareil à l'étuve à + 27°. Au moyen de cette méthode les levures, qui possèdent la propriété de former des ascospores, ont sporulé, dans la plupart du temps après une trentaine d'heures.

En ce qui concerne notre organisme, les examens effectués après 30 et 40 heures et après 3,5 et 15 jours ne nous ont jamais permis de trouver des formes ascosporées.

Ne nous en tenant pas à ce seul procédé, nous avons aussi tenté la même opération en nous servant du milieu spécifique de GORODKOWA. Nous avons préparé le milieu de culture suivant :

Eau distillée	100 gr.
Gélose	1 gr.
Peptone	1 gr.
Bouillon de viande	1 gr.
Chlorure de sodium	0 gr. 5
Glucose	0 gr. 25

Nous avons ensemencé sur ce substrat notre levure, elle végète assez bien durant les premières heures sur ce milieu, mais au bout du troisième jour, nous ne constatons pas de progrès dans sa croissance; les examens microscopiques effectués à diverses périodes ne nous ont jamais permis de découvrir des asques et des ascospores.

De l'ensemble de nos constatations nous pouvons conclure que notre organisme doit être rattaché suivant la classification de GUILLIERMOND à la famille des *Non-Saccharomycètées* et au genre *Cryptococcus* de KÜTZING-VUILLEMIN. Cette espèce est d'un beau rose, surtout sur les milieux maltosés; la teinte varie suivant la température et la composition des milieux de culture; elle se rapproche par sa coloration du *Cryptococcus salmoneus* (1907) et du *Cryptococcus Bainieri* (1906) tous deux déjà décrits par A. SARTORY et BAINIER. Elle diffère par sa forme et sa couleur du *Cryptococcus glutinis*. Nous proposons pour la désigner le nom de *Cryptococcus corallinus*.

Pouvoir pathogène : L'action pathogène expérimentale a été examinée sur des souris blanches et des cobayes. Ces essais nous ont paru nécessaires étant donné l'origine du champignon isolé au niveau de lésions rappelant les kérions trichophytiques. Le liquide d'inoculation a été obtenu par émulsion d'une öse de culture dans 5 cc. de sérum physiologique.

Trois souris blanches ont été inoculées au moyen de 3 cc. de cette émulsion; les animaux n'ont montré aucun

signe pathologique; ils ont tous survécu. La même épreuve pratiquée sur deux cobayes au moyen de 5 cc. d'émulsion de levure n'a amené aucun symptôme de maladie et ces animaux eux aussi ont survécu à l'inoculation.

Nous avons aussi essayé la contamination de souris et de cobayes par étalement de la levure sur le derme légèrement scarifié au moyen de papier de verre; les petites lésions formées par ce procédé n'ont pas évolué vers l'infection; elles se sont fermées très rapidement et spontanément. Ces expériences montrent par conséquent que l'espèce n'est pas pathogène et que l'on ne peut pas lui imputer les lésions constatées chez l'homme.

Chapitre II

Étude morphologique et biologique du Cryptococcus radiatus

Ses caractères culturaux et biochimiques

1° *Origine :*

L'organisme que nous décrivons ici a été, comme le précédent, isolé dans le laboratoire du professeur A. Sartory (81) à partir de cheveux envoyés par le docteur Hufschmitt. Ces poils provenaient de prélèvements opérés sur les membres d'une congrégation religieuse du *Haut-Rhin*, à la suite d'une véritable épidémie de chute des cheveux.

Les cheveux ont été coupés en petits fragments au moyen desquels nous avons pratiqué des ensemencements sur les milieux usuels, qui ont donné des cultures d'un organisme, que nous décrivons ci-dessous :

2° *Examen microscopique* des cultures en *goutte pendante* : Ces cultures ont été effectuées dans la chambre humide de Van Tieghem ; on a utilisé comme milieu de culture le moût de bière ; au bout de 48 heures on constate la croissance du champignon et l'examen microscopique montre de grosses cellules généralement rondes ; la forme ovale est exceptionnelle ; elles sont tantôt isolées tantôt bourgeonnantes ; lorsque ces éléments cellulaires bourgeonnent, les bourgeons se trouvent très souvent au nombre de deux du même côté ; certaines formes sont groupées en chaînettes et elles peuvent atteindre le nombre de 5 à 6 éléments. Les dimensions de ces éléments sont de 2 à 4 μ de diamètre. Les bourgeons arrivant à s'individualiser à un certain stade, grossissent et poussent eux-mêmes des bourgeons nouveaux. Jamais dans ces différentes cultures en cellule nous n'avons pu mettre en évidence des formes ascosporées.

3° *Colorations :* Pour vérifier les données que nous avons obtenues dans nos cultures en chambre de VAN THIEGHEM, nous avons effectué des examens de la levure après coloration vitale au rouge neutre, au *sudan III*, par la méthode de SASAKAWA, par celle de SCHUMACHER. Toutes ces préparations nous ont donné encore à ce point de vue des résultats concordants : nous n'avons jamais mis en évidence des asques et des ascospores.

4° *Caractères culturaux :* (Fig. 5)

Nous avons ensemencé notre organisme sur les milieux suivants solides et liquides : Milieu de SABOURAUD, maltosé et glucosé, pomme de terre, carotte, jus de pomme de terre gélatiné, gélatine, albumine d'œuf, banane, pomme de terre glycérinée, bouillon de viande, bouillon de viande glycériné, liquide de RAULIN neutre, acide, glucosé, eau de malt, moût de bière. La plupart des cultures ont été placées à + 22° température très favorable pour l'espèce considérée comme on le verra dans la suite de notre exposé. Toutefois, nous avons disposé certaines cultures à des températures comprises entre + 15° et + 37°.

Avant de décrire en détail les caractères culturaux de cette espèce sur chacun des milieux utilisés, nous signalerons quelques caractères de culture qui sont essentiels et généraux. Sur tous les milieux usuels la culture est rapide (1 à 2 jours environ) ; elle présente un aspect luisant ; l'enduit formé est peu épais et il envahit la totalité du substrat nutritif en moins de trois jours ; la culture est d'un beau rose ; la teinte est plus claire que celle de *Cryptococcus corallinus*, que nous avons décrit dans le précédent chapitre. Le dépôt formé dans les réservoirs des tubes de ROUX est très abondant. Contrairement à ce que nous avions constaté pour le *Cryptococcus corallinus* (ne cultivant à partir des poils qu'à une température de + 37°), ici nous obtenons des cultures toutes semblables entre elles à des températures de + 18°, + 22°, + 25°, + 27°. Elles sont toutes luisantes, peu adhérentes au milieu et elles ne se plissent jamais. Rappelons ici que les cultures du *Cryptococcus corallinus* étaient toutes plissées et que dans certains cas ces plissements prenaient un développement très exagéré. La coloration est toujours la même, tirant sur le saumon clair.

Culture sur milieu de Sabouraud : A + 37° nous ne constatons pas de développement au bout des premières quarante-huit heures; ce n'est que le quatrième jour après l'ensemencement que se forment des colonies d'abord roses, ponctuées qui s'étalent plus largement ensuite; elles sont très lisses et arrivent à un moment à donner des festons réguliers assez accentués ; signalons ici un détail qui a son importance pour la diagnose : à la périphérie les zones sont bien roses, au centre la teinte est beaucoup plus pâle; la partie centrale est mamelonnée, toujours très lisse, mais elle s'épaissit chaque jour davantage.

A + 27° ou à la température du laboratoire, la culture se fait beaucoup plus vite; le deuxième jour après l'ensemencement on peut déjà constater la formation des colonies; par la suite elle devient très luxuriante et les diverses colonies formées se réunissent pour donner une vaste bande lisse, rose, à bords festonnés.

L'examen *microscopique* pratiqué avec et sans coloration nous montre des cellules levures essentiellement rondes, bourgeonnantes la plupart du temps; ces éléments mesurent de 2 à 3 μ de diamètre. (Fig. 2)

Si on effectue l'ensemencement sur de grandes boîtes de Pétri de façon à produire la formation de colonies géantes, l'organisme donne dans les premiers jours de petites colonies se rejoignant bientôt pour former un tapis homogène. A un certain stade les bords sont légèrement festonnés, puis par la suite un phénomène assez curieux est constatable : il apparaît à la périphérie du tapis ainsi formé des prolongements qui se développent de plus en plus, simulant dans certains cas l'allure générale d'une *araignée,* quelquefois ressemblant à des *mille pattes ;* de toute façon ces prolongements se forment constamment et affectent la forme des épines de certains *radiolaires.* (Fig. 4)

Milieu de pomme de terre : Sur ce milieu, à la température de + 24° après 48 heures d'ensemencement, la culture évolue très favorablement; mais ici il faut signaler une différence notable avec celle que nous venons de décrire sur le milieu de Sabouraud : la culture sur pomme de terre est loin d'être lisse; elle est tout à fait mate, pas du tout luisante

et par ces caractères elle semble se rapprocher du *Cryptococcus corallinus ;* assez souvent même, la culture revêt un aspect poussiéreux, plâtreux surtout à la partie supérieure du substrat; elle n'apparaît un peu luisante qu'au voisinage immédiat du réservoir du tube de ROUX, c'est-à-dire dans les régions d'humidité maxima. La culture est élevée au centre, formant une sorte de petite langue semée de très légers vallonnements; les bords sont festonnés et souvent très contournés. La pomme de terre est totalement couverte par le tapis levurien après un temps variant entre quinze et dix-huit jours; la zone supérieure est toujours plâtreuse et malgré nos nombreux examens effectués sur des prélèvements faits en diverses régions du tube, ni sur ce milieu, ni sur le substrat précédent, jamais nous n'avons pu constater la présence d'*asques*, ni d'*ascospores*, bien que dans certains cas nous ayons attendu très longtemps pour faire nos préparations. A l'examen microscopique on voit toujours de grosses cellules rondes ou ovales tantôt isolées, tantôt bourgeonnantes; souvent ce bourgeonnement se fait deux fois sur le même côté; certaines formes se présentent en chaînettes de trois, quatre, cinq ou six éléments.

Sur *carotte* la culture est très luxuriante, ne s'épaissit pas et forme un tapis rouge d'une épaisseur uniforme, lisse sans pli; en cinq à huit jours tout le milieu est envahi. Sur *gélose* et *gélatine* la culture est satisfaisante.

Sur *banane*, *pomme de terre glycérinée* nous constatons la formation de cultures assez luxuriantes.

Nos ensemencements pratiqués sur les milieux liquides nous ont donné les résultats suivants :

Sur liquide de RAULIN nous assistons à la formation d'un voile dont nous avons essayé de fixer les conditions d'apparition : A la température de + 15° le voile ne se forme pas; à + 20° un voile rose apparaît au bout d'une période de quatre jours; à 24° le voile rose est constatable au bout de deux jours; à + 34° ainsi qu'à + 37° il n'y a pas formation de voile. Lorsqu'il se forme, ce voile est léger, rosé, fragile et non plissé; il tombe rapidement au fond du tube de culture.

Dans le *bouillon* il se forme au bout de deux jours un léger voile, qui, par la suite, ne tarde pas à tomber au fond

du tube où il constitue un dépôt peu abondant. Ce milieu ne paraît aucunement favorable pour la culture de notre *Cryptococcus*.

Sur moût de bière la culture est très avancée déjà après 24 heures d'ensemencement· le voile s'épaissit par la suite; il est résistant; en même temps qu'il se forme, au fond du tube se dépose une certaine quantité de culture; le dépôt devient très abondant au bout de six à huit jours.

Propriétés biologiques : L'optimum cultural qui a d'abord été l'objet de nos préoccupations a été recherché au moyen de cultures effectuées sur moût de bière et sur milieu de Raulin; nous les avons disposées à différentes températures comprises entre + 10° et + 40°. Nous avons constaté le maximum de croissance et obtenu les meilleures récoltes pour les températures comprises entre + 22° et + 25°. A + 40° nous ne constatons plus aucune croissance de même qu'à + 12°.

Ici aussi comme pour l'espèce précédente nous avons employé, pour déterminer la *concentration optima en ions H* des milieux de culture, le moût de bière; la mesure de la concentration en ions H des divers milieux a été effectuée en se servant du *potentiomètre* et de l'*électrode à antimoine*. Une série de tubes renfermant le milieu a été utilisée pour constituer une gamme de pH croissants depuis pH=4 jusqu'à pH=9. Chacun des tubes ainsi traité a été ensemencé et placé à la température de + 22°. Nous avons examiné chacune de ces cultures après un temps qui pour une série était de 48 heures, pour l'autre gamme de 4 jours de culture; les cultures ont été traitées suivant la technique que nous avions employée pour le *Cryptococcus corallinus*. Nous avons obtenu la meilleure récolte pour les milieux amenés à pH=6,3. Les limites de croissance sont fixées pour les pH=7,2 et 5,5.

Nous avons en même temps effectué des mesures pour étudier l'influence de la concentration des milieux en ions H sur la production du pigment; nous les relatons dans le chapitre ayant trait à l'étude des pigments des deux *Cryptococcus*.

Nos essais concernant l'action de la lumière sur la levure en expérience nous ont permis la conclusion que les rayons

lumineux n'avaient aucune influence marquée sur la croissance de notre organisme à condition de rester dans les limites de températures observées.

Propriétés biochimiques : La même technique que nous avons énoncée à propos de notre première champignon, a été appliquée ici même; nous croyons inutile d'en rappeler les différentes modalités : nous nous contenterons de mentionner ici les résultats obtenus.

Le milieu renfermant l'azote à l'état de sel ammoniacal (en l'espèce du sulfate d'ammonium) est de beaucoup plus favorable que le milieu nitraté. Sur ce premier milieu l'examen microscopique permet de voir des formes levures absolument comparables à celles qui se produisent sur le milieu de SABOURAUD ou le *moût de bière ;* nous n'avons pas obtenu de formes de souffrance alors que nous devons signaler une tendance très marquée de notre organisme vers ces formes de souffrance, lorsqu'il est cultivé sur le milieu nitraté. En outre, sur le milieu ammoniacal la végétation se fait beaucoup plus vite et la culture acquiert une luxuriance que nous ne retrouvons jamais sur le premier milieu.

Action sur les sucres : Le milieu de base a été aussi ici le liquide de RAULIN dépourvu de sucre, dans lequel nous avons ajouté, pour chaque expérience, le sucre à étudier : glucose, lévulose, galactose, mannose, saccharose, maltose et lactose. Ces milieux préparés avec tout le soin nécessaire pour éviter toute interversion, nous avons pris la précaution d'établir des tubes témoins, qui, eux, n'ont pas été ensemencés, mais soumis à toutes les conditions des tubes réservés à la culture de notre organisme. Des dosages ont été pratiqués dans ces divers tubes témoins, afin de déceler toute interversion qui aurait pu se produire. Pour contrôler l'assimilation des sucres par la levure, nous avons fait usage de la méthode de BERTRAND.

En outre, nous nous sommes adressé au tube B de BESSON, RANQUE et SENEZ pour déterminer la réduction du rouge neutre, les phénomènes d'alcalinisation ou d'acidification du milieu, la production ou l'absence de gaz et l'approximation de la quantité de gaz formée.

Dans ces conditions nous avons constaté que l'espèce envisagée ne réduisait pas le rouge neutre. Vingt-quatre heures après l'ensemencement il se produit un virage du milieu vers la teinte amarante ce qui est l'indice d'une *acidification du milieu*; en aucun moment le tube à hémolyse n'a quitté le fond du grand tube de culture et constamment il est resté complètement rempli du liquide nutritif. Ce qui dénote donc l'*absence de gaz.*

La recherche de l'*acide lactique* effectuée suivant le même procédé déjà décrit à propos du *Cryptococcus corallinus* (réactif d'UFFELMANN) nous a donné des résultats positifs. Aucune fermentation gazeuse, ni production d'alcool n'ont été mises en évidence. La dégradation du glucose par la levure expérimentée se passe donc suivant le même processus que pour le *Cryptococcus corallinus*. Pour les *autres hydrates de carbone* nous avons utilisé la même technique et pour avoir une idée de l'assimilation de ces substances par notre levure nous avons eu recours à des dosages au moyen de la méthode de BERTRAND. Ces dosages expriment les quantités de sucres disparues des milieux du fait de la culture de notre micro-organisme. Le phénomène est noté dans le tableau suivant par le signe +; sont importance quantitative est exprimée par la quantité disparue pour 100.

Glucose	Lévulose	Galactose	Mannose	Saccha-rose	Maltose	Lactose	Amidon
Ass. % + 3,62	Ass. % + 1,03	Ass. % 0 0	Ass. % 0 0	Ass. % + 2,26	Ass. % + 2,21	Ass. % 0 0	Ass. +

On voit nettement en consultant le précédent tableau que notre organisme n'utilise pas le galactose, le mannose et le lactose. Le lévulose est un sucre qui n'a qu'un intérêt médiocre pour la nutrition de notre champignon.

Le glucose, la saccharose et le maltose sont de bons aliments, qui favorisent la croissance de notre espèce. En ce qui concerne la pigmentation aucune modification appréciable n'a été constatée. L'apparition de la coloration se fait au bout des mêmes temps et avec la même intensité.

Action sur les matières azotées : Recherches sur les *propriétés protéolytiques :* Notre levure a été ensemencée tout d'abord sur des tubes renfermant du sérum coagulé; les cultures ont été disposées à + 22° : la poussée de l'organisme sur ce milieu est de beaucoup moins luxuriante que sur milieu de SABOURAUD, pomme de terre et carotte; elle débute par des points roses à bords lisses s'élargissant peu à peu. A la température de + 37° la poussée est ralentie, mais l'organisme reste d'un beau rose saumon (rappelons ici que dans ces conditions le *Cryptococcus corallinus* étudié précédemment prend une teinte blanche) . Après un mois de culture aucun phénomène de liquéfaction du sérum n'a été constaté.

Nous avons ensuite ensemencé notre levure sur *albumine d'œuf :* le milieu était disposé en petits cubes dans du bouillon de bœuf; on constate la formation d'un faible voile peu résistant; jamais l'abumine d'œuf n'a été liquéfiée; nous n'avons non plus constaté aucune attaque de cette substance par la levure.

Des ensemencements ont été ensuite pratiqués sur *gélatine* et les cultures disposées à + 18°. Après un mois de séjour à cette température aucune liquéfaction du milieu n'a pu être mise en évidence.

Les cultures effectuées sur des tubes contenant du *lait tournesolé,* à la température de + 18°, nous ont donné les résultats suivants : Le lait n'est pas coagulé, même après vingt jours de culture.

Cultures sur *milieux spéciaux* pour favoriser la *production des ascospores* : Notre espèce, après avoir subi un rajeunissement par repiquages répétés sur moût de bière, a été ensemencée d'une part sur des blocs de plâtre et de l'autre sur milieu de GORODKOWA. Sur ces milieux nous avons opéré des prélèvements après 30, 40 heures et après 3, 5 et 15 jours. Nous avons effectué à partir du matériel des préparations microscopiques , celles-ci ont été examinées avec le plus grand soin; en aucun cas nous n'avons décelé des asques et des ascopores.

Si nous nous rappelons les diverses données fournies par l'examen microscopique, les propriétés de l'organisme sur les différents milieux de culture, ses caractères biolo-

giques et biochimiques, nous sommes en droit de le ranger selon la classification de GUILLIERMOND dans la famille des *Non-Saccharomycétinées* et dans le genre *Cryptococcus Kutzing-Vuillemin*. Par ses dimensions et son aspect cultural, en même temps que par ses propriétés biologiques, la levure étudiée se distingue du *Cryptococcus salmoneus*. Nous proposons pour la désigner le nom de *Cryptococcus radiatus*, en égard à son aspect sur milieu de SABOURAUD en boîtes de PÉTRI.

Pouvoir pathogène : L'action pathogène expérimentale de cet organisme a été examinée par des inoculations intrapéritonéales et des étalements sur le derme légèrement scarifié au moyen de papier de verre . Les animaux qui nous ont servi pour nos expériences sont : le cobaye et la souris. Ces essais ont été pratiqués sur deux cobayes et 2 souris blanches. Aucun phénomène pathologique ne s'est produit et les animaux ainsi traités sont restés bien portants : ce qui nous fait conclure à la non-pathogénéité du *Cryptococcus radiatus*.

Chapitre III

Conditions d'apparition des deux pigments étudiés Leur localisation

Conditions chimiques: Pigment du Cryptococcus corallinus : Au cours de nos expériences ayant pour but de fixer les propriétés morphologiques et biologiques de l'espèce même, nous avons pu nous rendre compte que le milieu de Raulin maltosé gélosé était très favorable pour la production du pigment; c'est pour ces raisons que nous avons utilisé tout d'abord ce substrat pour éxaminer les conditions d'apparition de la substance colorante. Puis nous nous sommes demandé si la gélose (étant la seule matière quaternaire organique contenue dans ce milieu) pouvait être rendue responsable du phénomène chromogène; pour cette raison nous avons pratiqué des ensemencements au moyen de notre champignon sur un milieu de Raulin liquide et maltosé. La levure s'est développée très vite et nous avons constaté dès le troisième ou quatrième jour de culture à la température de + 27°, la formation d'un dépôt rosé au fond du tube. Ainsi donc ceci nous prouve que la propriété pigmentaire ne dépend pas de la présence d'une substance protéique dans le milieu.

D'autre part en remplaçant le maltose par d'autres substances ternaires telles que différents monosaccharides et bioses, l'amidon, la glycérine en proportions convenables, la fonction chromogène n'est aucunement influencée dans son apparition; au point de vue intensité de teinte, par contre la qualité des aliments joue naturellement un rôle. Nous voyons par conséquent que l'apparition du pigment n'est pas tributaire d'une substance quaternaire ou ternaire

spécifique et sa formation doit être en relation avec d'autres facteurs. Notons ici la nécessité absolue de l'aliment hydrocarboné pour l'obtention du phénomène chromogène. Pour éclaircir ce point nous avons successivement supprimé dans notre milieu les ions : fer, zinc, magnésium, phosphore, soit un par un, soit en soustrayant deux de ces éléments à la fois. L'absence de ces substances minérales n'a pas empêché la formation du pigment ; celui-ci par conséquent a la propriété de se former dans des conditions chimiques fort différentes les unes des autres.

Les mêmes constatations ont pu être faites lors de l'étude du pouvoir chromogène propre au *Cryptococcus radiatus :* ici encore l'absence de matières quaternaires, les modifications qualitatives des matières ternaires et enfin la suppression de tel élément minéral ou de tel autre n'ont pu détruire la fonction chromogène.

Conditions physiques : Influence de l'oxygène : Toutes nos recherches décrites jusqu'ici ont été effectuées en aérobiose stricte.

Toutefois en cultivant nos levures dans des tubes fermés au moyen d'un capuchon de caoutchouc surajouté au bouchon de coton directement après l'ensemencement, nous avons pu constater, que l'apparition du pigment faisait soit complètement défaut, soit était excessivement peu sensible ; nous basant sur cette observation nous avons cultivé nos deux levures dans des tubes de Roux à anaérobiose où nous avions pratiqué le vide à 50 cm. Les champignons évoluaient à peine ; cette évolution cessait d'ailleurs bientôt et jamais il ne nous a été donné de constater la production d'un pigment. On voit donc par ces essais que l'oxygène est un élément absolument indispensable à la fois par la croissance normale de nos deux levures et pour l'apparition des matières chromogènes.

Influence de la température : Pour étudier l'action de la température sur la fonction chromogène des deux champignons, nous avons disposé des tubes de culture ensemencés à différentes températures comprises entre + 5° et + 42°. Le milieu utilisé dans ces expériences a été la gélose de Sabouraud maltosée. Nous avons ainsi pu constater pour

le *Cryptococcus corallinus* les différences suivantes : à + 37° la levure reste blanche et le pigment n'apparaît en aucun cas; à la température de + 27° le pigment fait son apparition dès le deuxième jour après l'ensemencement; avec le temps celui-ci fonce de plus en plus : en effet, au début il était rose pâle, puis devient rose très tôt; si l'on cultive davantage, la coloration passe au rose saumon et même au rouge corail. Les teintes correspondent aux numéros 51, 52, 56, 61, 66 du code des couleurs (82). Comme limites de températures pour la production de la substance chromogène, nos expériences nous ont montré que le phénomène avait lieu entre les températures de + 8° jusqu'à + 28°.

Quant au *Cryptococcus radiatus* on a pu faire les constatations suivantes en expérimentant dans les mêmes conditions: les nuances de teinte sont beaucoup moins sujettes à variation que dans le cas précédent. En effet, la teinte est stable pour les températures comprises entre + 12° et + 37°; elle correspond aux numéros 81 et 86 du code des couleurs.

Influence de la concentration du milieu de culture en ions H : Dans une série de milieux nous avons fait varier la concentration en ions H de façon que les pH initiaux de culture constituent une gamme allant de pH=2,85 jusqu'à pH=8,60. Nous avons ainsi pu constater que pour les deux champignons l'apparition du pigment était en rapport direct avec la concentration en ions H du milieu. Dans les milieux à pH initial de 6,6 l'apparition du pigment était retardée par rapport au milieu à pH initial de 5,5 par exemple et ceci malgré que le premier milieu était un substrat de choix pour le développement des levures. La pigmentation a toujours été amenée à un maximum sur des milieux dont le pH était inférieur à 5,5; par contre l'extrême limite pour la coloration est réalisée pour un pH de 7; mais dans ces milieux le phénomène chromogène se produit seulement vers le cinquième ou le sixième jour de culture et si on prend la précaution de mesurer à ce moment la concentration en ions H, on constate que, à la suite du métabolisme nutritif du champignon, la concentration en ions H a fortement augmenté et se fixe à ce moment aux environs de 6,2.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce sujet lors de l'étude des pigments mêmes. Nous avons pu établir que les

deux levures évoluaient vers des formes achromogènes aussitôt qu'elles sont placées sur des milieux à pH alcalin.

Localisation de la substance chromogène : Dans cet ordre d'idées nous reviendrons tout d'abord sur la classification établie par BEIJERINCK (83) pour les microorganismes colorés : cet auteur distingue :

1° des microorganismes dont le contenu cellulaire même est coloré et

2° ceux dont le corps reste invariablement incolore, tandis que le milieu ambiant prend une pigmentation due à une secrétion organique; ce dernier groupe est appelé par cet auteur : *microorganismes chromopares ;* tandis que les formes ou le colorant sécrété est fortement lié à la membrane cellulaire sont désignées sous le terme de parachromopares.

De cette classification on peut déduire immédiatement que dans le monde des infiniment petits on a affaire à deux catégories de colorants : les uns solubles dans l'eau et les substrats aqueux, les autres insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques ordinaires.

Il convient d'insister ici sur un troisième groupe de microorganismes, dont le corps même est coloré : ils ont été appelés *microorganismes chromophores* et constituent la classe la plus importante des infiniment petits colorés.

C'est dans cette dernière catégorie que nous rangeons les deux *Cryptococcus* étudiés. En effet, si on examine au microscope une culture en goutte pendante de ces éléments cellulaires, on constate que la cellule entière est colorée et qu'il ne s'agit pas de champignons *parachromopares*, dont seule la membrane fixe la substance chromogène, ni d'espèces possédant des chromoblastes ou des vacuoles lipidiques qui par réfringence paraissent pigmentées.

D'autre part, si on fait usage de culture en goutte pendante pour pratiquer un examen au *microspectroscope* de ZEISS, on observe chez le *Cryptococcus corallinus* coloré en rose *sept bandes d'absorption* plus ou moins nettes. Ces bandes ont leur maximum d'intensité aux longueurs d'onde suivantes exprimées en unités Å :

a = 6220 b = 6035 c = 5800 d = 5645
e = 5480 f = 5200 g = 4900.

La largeur de ces bandes et l'aspect général du spectre d'absorption varient naturellement avec la concentration et l'épaisseur de la couche colorée soumise à l'examen. Notons cependant que la bande a, ainsi que les bandes c, d et e sont en général très prononcées, tandis que les bandes b et f sont plus estompées et la bande g est presque toujours très difficile à saisir. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce sujet plus tard, ayant pu, au cours de nos recherches, observer que malgré la grande ressemblance chimique de nos deux pigments, le *Cryptococcus radiatus* examiné dans des conditions analogues ne présentait presque toujours que trois, au maximum quatre bandes. Ce fait nous ayant frappé, il nous a paru intéressant d'approfondir cette question.

Chapitre IV :

Essais d'isolement des deux pigments

Méthode physique de Goppelsrœder (84) basée sur l'*analyse capillaire :*

Nous avons fait appel à cette méthode afin d'examiner aussi vite que possible si nos pigments correspondaient à une ou à plusieurs substances colorantes. Un autre avantage de cette méthode nous a séduit : on peut facilement obtenir le colorant à l'état de pureté en découpant les bandes d'absorption dans le papier capillaire employé. On peut de plus obtenir les pigments à un état assez pur pour les contrôler au point de vue spectroscopique. Nous avons effectué cette analyse selon toutes les données nécessaires pour empêcher les altérations et les causes d'erreur.

Etant donné l'insolubilité des pigments étudiés nous avons opéré selon les principes indiqués par Frenkel (85) : des raclages de culture sur milieu solide ont été pratiqués et les cellules levuriennes soumises à l'action d'une solution hydro-alcoolique alcalinisée faiblement au moyen de la soude; le tout a été introduit dans des tubes à essai fermés au moyen d'un capuchon en caoutchouc avec les bandes de papier filtre coupées dans le sens de la longueur des fibres, de 2 centimètres et demi de largeur et de trente centimètres de longueur. Celles-ci ont été suspendues librement à l'intérieur des tubes; après 24 heures l'ascension du solvant et du pigment avait atteint son maximum et à ce moment on prélève les bandes; on les sèche et on les utilise pour l'examen.

A l'aide de cette méthode nous avons pu constater que dans les deux cas nous avions affaire à une substance chromogène unique; d'autre part , examinées spectroscopiquement, nous avons vu que le pigment du *Cryptococcus corallinus* ne

possédait cette fois-ci que quatre bandes d'absorption, qui correspondaient aux longueurs d'onde suivantes : 620, 580, 520 et 490.

Méthode chimique d'isolement :

Etant donné la non-diffusibilité du colorant dans le milieu ambiant pour les deux champignons étudiés et vu la proche parenté botanique de ces espèces avec le *Cryptococcus salmoneus* nous avons tout d'abord essayé d'isoler les pigments suivant les techniques employées par notre cher maître lors de l'étude de sa levure. On a fait usage comme solvant des produits couramment employés dans ce but et qui ont réussi pour l'isolement du pigment du *Cryptococcus salmoneus.*

Les pigments des deux levures sont cependant non solubles dans l'alcool méthylique, dans l'alcool éthylique, dans l'éther, dans l'acétone, le chloroforme, la benzine et le sulfure de carbone, ce qui différencie nettement nos deux organismes du *Cryptococcus salmoneus.*

C'est pour ces raisons d'insolubilité dans les solvants employés ordinairement en chimie biologique que nous avons été obligé d'avoir recours à d'autres méthodes.

La technique de Thumm (86) ainsi que celle de Grimbert-Lasseur (87) employées pour les bactéries ne pouvait pas nous donner satisfaction vu qu'elles s'adressent à des micro-organismes chromopares ou parachromopares, dont le pigment diffuse dans le milieu ambiant et est ordinairement soluble dans l'eau.

La méthode d'isolement utilisée par Willstætter (88) et son école en ce qui concerne l'extraction des pigments *anthocyaniques,* basée sur une hydrolyse préalable au moyen de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique et épuisement du milieu hydrolysé par agitation avec l'alcool amylique ne nous a pas donné non plus des résultats positifs.

Nous avons alors eu recours à la technique par absorption en triturant et en broyant les corps levuriens avec du sable purifié ou avec d'autres substances inertes et en épuisant ensuite la pâte ainsi obtenue au moyen de différents solvants; le résultat fut encore négatif.

Une autre méthode essayée par nous a été celle de Fresenius (89) passé dans le domaine classique pour l'analyse alimentaire en ce qui concerne les produits farineux ou les œufs en conserve. Les produits à examiner sont traités tout d'abord avec de l'éther, ensuite épuisés par l'acétone; le liquide acétonique obtenu est ensuite traité au moyen d'acide acétique ou d'alcool à 95°; dans la solution acide il est possible de fixer le colorant sur de la laine; le liquide alcoolique est employé pour des recherches réactionnelles vis-à-vis des acides et des bases, ainsi que pour les phénomènes de réduction et d'oxydation. Cette technique ne nous a pas permis d'isoler les pigments.

Au cours de nos analyses d'hydrolyse pour la recherche des *anthocyanes* nous avons observé un phénomène qui finalement nous a mis sur la bonne voie. En effet, si on emploie une émulsion levurienne dans de l'eau distillée acidulée au moyen de l'acide chlorhydrique en vue de l'hydrolyse et si on a recours ensuite à une solution basique concentrée au lieu d'alcool amylique, on observe l'apparition d'une teinte brun jaunâtre dans la solution aqueuse et les corps mycosiques se décolorent. C'est ce phénomène qui nous a amené à employer la méthode de Rota (90) pour la différenciation des divers pigments.

100 grammes d'éléments levuriens pesés à l'état humide ont été émulsionnés dans 200 cc. d'eau distillée; à cette émulsion nous avons ajouté 5 grammes d'acide chlorhydrique concentré et 5 grammes d'une solution à 10 % de chlorure d'étain. Cette dernière solution est préparée extemporanément par dissolution de l'étain dans de l'acide chlorhydrique. Le mélange est vigoureusement agité, puis chauffé pendant 15 minutes au B. M. à 100°.

D'autre part nous employons la même émulsion levurienne en introduisant uniquement de l'acide chlorhydrique. En comparant les deux échantillons mis en réaction nous n'avons pas pu constater aucune différence. Il s'agit donc de substances chromogènes non réductibles.

Une émulsion levurienne toujours de même concentration acidulée par l'acide chlorhydrique et chauffée au B. M. a été ensuite alcalinisée par une solution de soude à 20 %; par ce

procédé nous constatons, comme nous l'avons déjà mentionné antérieurement, une activation de la coloration dans la solution aqueuse.

D'après la classification de ROTA les substances chromogènes ayant ces propriétés doivent être rangées dans le groupe des colorants dérivés de l'*oxyanthraquinone* que cet auteur fait entrer dans la quatrième classe de sa systématique.

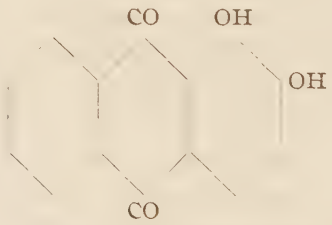
Dans cette classe ROTA distingue entre les colorants dérivés du *diphénylméthane non amidé* et les substances dérivés de l'*oxyanthraquinone*, dont la plus grande partie constituent des colorants organiques naturels.

Le *diphénylméthane* est un hydrocarbure qui donne par oxydation une cétone : la *benzophénone*. Le di-amino-tetraméthylate de la benzophénone sert de matière première à la synthèse du seul colorant de ce groupe employé dans la technique des colorations. Il est désigné sous le nom d'*auramine*.

Le groupe chromophore de ces colorants est le suivant :

$$= \overset{R}{\underset{R}{C}} = N - H$$

En ce qui concerne les matières pigmentaires dérivées des oxycétones le groupe chromophore est constitué comme suit :



On réunit dans ce groupe des colorants assez hétérogènes qui sont cependant d'une constitution assez semblable : les deux représentants les plus connus de ce groupe sont : l'*alizarine* qui est une *di-oxy-anthraquinone* et la *purpurine* qui est une *tri-oxy-anthraquinone ;* comme colorant organique naturel du même groupe on peut signaler encore le *carmin*.

Afin de caractériser plus profondément la substance chromogène obtenue ainsi en solution aqueuse, nous avons effectué les essais suivants : une partie de la solution a été évaporée dans le vide sulfurique jusqu'à concentration sirupeuse; à l'aide de ce produit nous avons effectué une solution alcoolique dans laquelle nous avons ajouté quelques gouttes d'une solution de perchlorure de fer à 1 pour 1000. La teinte rouge brun de la coloration initiale passe au vert olive; cette réaction nous permet de ranger notre substance colorante dans le groupe des *oxycétones*, car les colorants du groupe dérivés du *diphénylméthane* ne réagissent pas avec le perchlorure de fer. D'autre part les colorants de ce groupe sont ordinairement directement solubles dans l'eau et se fixent électivement sur la laine, sans qu'il soit nécessaire d'opérer un mordançage préalable. Nous avons vu que nos pigments sont, à l'état natif, insolubles dans l'eau et ne colorent pas la laine sans mordançage. Nous nous croyons par conséquent en droit de ranger les deux pigments isolés de nos levures dans le groupe des dérivés *oxycétoniques*.

Dans le but de déterminer plus étroitement la place de ce colorant, nous avons, à l'aide de nouvelles solutions préparées en partant de levures émulsionnées dans l'eau et traitées par un alcalin, continué nos recherches.

La solution aqueuse alcaline possède une teinte initiale rouge brun. Si on filtre pour séparer les éléments levuriens du liquide et les substances protéiniques ayant pu passer dans la solution, et si l'on ajoute de la potasse en excès, la teinte rouge brun passe au rouge violet, ce qui nous permet de ranger nos substances chromogènes parmi les *di-* ou *tri-cétones* étant donné que les *mono-cétones* présentent à cet état des colorations jaunes ou jaune rougeâtres.

La réaction suivante nous a en outre permis de vérifier cette constatation : la solution alcaline initiale traitée au moyen d'acide chlorhydrique en excès ou avec de l'acide acétique précipite de la solution aqueuse le chromogène acide du colorant sans détruire cette substance . Les dérivés *mono-cétoniques* des oxyanthraquinones par contre se décomposent par cette réaction *(benzophénones)* ou se colorent d'une manière intensive en jaune *(flavones, quercétines)*.

Cette solution précipitée agitée avec de l'éther abandonne la substance chromogène au solvant organique, ce qui indique que nous avons affaire avec un *oxyanthraquinone* non sulfoné, avec le groupe chromophore :

Ceci est aussi en accord avec nos constatations lors de l'étude sur l'apparition du colorant dans les différents milieux de culture, alors que nous examinions l'influence des différentes substances minérales sur l'apparition du pigment. Nous avons pu constater que le pigment apparaissait même en l'absence de l'élément soufre, ce qui confirme nos résultats chimiques.

Ayant ainsi assigné une place, dans la systématique des colorants naturels, à nos pigments, nous avons pu démontrer qu'ils entrent dans la classe des *oxyanthraquinones* à noyau *dicétonique* non sulfoné.

Nous nous sommes ensuite livré à l'analyse élémentaire de notre substance de manière à vérifier ces faits.

Analyse élémentaire : Pour mener à bien cette analyse élémentaire, nous nous sommes adressé à la solution alcaline dont nous avons parlé plus haut; nous avons précipité la substance chromogène dans cette solution par l'addition d'acide chlorhydrique. Nous avons traité ce précipité par l'éther; il se dissout dans ce solvant. La solution éthérée a été ensuite soumise à l'évaporation et nous obtenons enfin une matière fortement colorée en jaune rougeâtre. C'est ce produit qui nous a servi pour notre analyse élémentaire : Les essais nombreux que nous avons effectués nous ont démontré la présence de carbone, d'*hydrogène* et enfin d'*oxygène ;* en aucun cas nous n'avons pu mettre de l'*azote* en évidence.

Le produit résultant de l'évaporation de la solution éthérée a été expérimenté au *bloc Maquenne* afin de déterminer le point de fusion et le point de carbonisation. Le produit supporte sans altération une chaleur de 230° à 235°. Le point

de fusion est situé à 244° à 245°; à cette température la fusion s'opère instantanément. La sublimation s'opère sans altération. Chauffé jusqu'à la carbonisation en présence de sodium nous n'avons pas pu observer d'odeur de *phénol ;* par contre on perçoit une odeur de *pyrocathéchine* ou d'*amandes amères;* le charbon repris par l'eau donne une solution dans laquelle la recherche des *cyanures* a été négative. Ce qui prouve l'absence de l'azote dans notre produit.

L'analyse élémentaire effectuée sur trois échantillons différents toujours à l'aide du même produit employé à des doses différentes nous à donné en moyenne pour 100 :

$$C = 73{,}39$$
$$H = 4{,}95$$

Le poids moléculaire a été déterminé par la méthode cryoscopique sur une solution aqueuse alcaline, dont le titre de KOH était de 1 %. Sachant que la constante d'abaissement du point de congélation de la solution aqueuse alcaline déterminé à l'avance était de $\triangle = 0{,}3426$, la différence de la valeur des deux $\triangle$ nous a permis de calculer le poids moléculaire de la substance. Nous avons employé une solution renfermant 1 % du colorant.

Pour calculer le poids moléculaire nous nous sommes adressé à la formule :

$$Pm = \frac{KC}{\triangle}$$

L'abaissement du point de congélation de notre solution a été mesuré et nous a donné $\triangle = 0{,}3937$.

Sachant que l'abaissement du point de congélation de notre solution de potasse à 1 % est de 0,3426, nous avons calculé l'abaissement du point de congélation dû au colorant dissous soit :

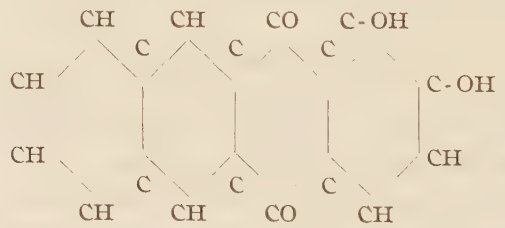
$$\triangle = 0{,}3937 - 0{,}3426 = 0{,}0511$$

Si donc nous calculons le poids moléculaire en nous servant de la formule précédemment exposée nous avons :

$$Pm = \frac{18{,}7}{0{,}0511} = 366$$

Nous avons fait les mêmes mesures au moyen de la matière colorante obtenue par épuisement de la solution acide primitive par l'éther. Nous avons mesuré l'abaissement du point de congélation d'une solution renfermant 1 % de cette substance chromogène. Le calcul du poids moléculaire nous a donné : 294. Par conséquent la diminution de valeur de ce poids moléculaire correspond à une différence de 72. Tenant compte de ce que nous avons affaire tout d'abord à la matière colorante à l'état hydraté, ensuite à la matière colorante déshydratée, nous nous croyons en droit de rapporter la différence de la valeur des poids moléculaire = 72 à l'eau de cristallisation. Le poids moléculaire de l'eau étant de 18, le chiffre de 72 correspondrait par conséquant à 4 H^2 O.

Ayant constaté antérieurement par les réactions chimiques que nous étions en présence d'un dérivé *oxycétonique* dont nous connaissons le groupe chromophore, comme équivalent à la formule C^{14} H^8 O^4 (alizarine ou hystazarine), nous savons que le poids moléculaire de ces deux corps équivaut à 240. Le poids moléculaire de notre substance chromogène déshydratée étant de 294, la différence entre ces deux poids moléculaires est de 54. Ce poids pourrait s'appliquer à un noyau de C^4 H^6 ayant la même valeur moléculaire. Nous aurions par conséquent affaire à un corps dont nous pourrions nous représenter la structure chimique de la façon suivante :



La substance chromogène obtenue en solution alcaline au moyen de la potasse cristallise dans le *système clinorhombique ;* la coloration est *pourpre ;* au moyen de la soude on obtient des aiguilles en *buisson* d'une coloration *violacée.*

En ce qui concerne le pigment sécrété par le *Cryptococcus corallinus*, la solution aqueuse provenant de l'hydrolyse et débarrassée de la matière chromogène par épuisement à l'éther a été filtrée, puis partagée en deux portions.

La première mise en contact avec la liqueur de FEHLING et chauffée à ébullition nous a montré la réduction du réactif.

D'autre part, la deuxième portion a été mélangée a 0,5 gr. d'acétate de soude et 0,25 gr. de phénylhydrazine. Le tout chauffé pendant 2 heures au bain-marie a donné un précipité qui, cristallisé de 15 cc. d'alcool à 50°, a présenté les caractères des *glucosazones*.

Notre colorant doit donc rentrer dans le groupe des *glucosides* et le glucose a été libéré de la *leucobase* par l'hydrolyse. Ceci est d'autant plus certain que la matière chromogène ne se forme, comme nous avons pu le prouver antérieurement, qu'à condition de cultiver l'organisme sur des milieux contenant des hydrates de carbone comme matières ternaires.

Notons ici que la levure cultivée dans un milieu hydrocarbonée renfermant initialement de l'émulsine, reste incolore malgré sa croissance luxuriante.

Chapitre V

Recherches sur les propriétés physiques des pigments

A. *Analyse spectroscopique :*

Les recherches spectroscopiques ont été pratiquées au moyen de plusieurs liquides de concentration différente :

Lors de l'étude des conditions d'apparition des pigments, nous avons eu l'occasion d'indiquer les bandes d'absorption que nous avons notées à l'examen par le *microspectroscope* de Zeiss, bandes observées sur l'organisme même. Ces bandes ont leur maximum d'intensité aux longueurs d'onde suivantes :

a = 6220 Å, b = 6035 Å, c = 5800 Å, d = 5645 Å, e = 5480 Å, f = 5200 Å, g = 4900 Å.

Toutes ces bandes ont été toujours observables sur le *Cryptococcus corallinus*, tandis qu'en ce qui concerne le *Cryptococcus radiatus* nous avons très souvent observé seulement 3 ou 4 bandes. Ce fait nous ayant frappé, nous avons cultivé le *Cryptococcus corallinus* sur un milieu à un pH initial de 7,2. L'examen microspectroscopique a été alors effectué le quatrième et le cinquième jour de la culture, alors que l'apparition du pigment faisait encore complètement défaut. Cette analyse nous a alors permis de constater que la levure présentait, même à l'état achromogène, un spectre caractéristique avec des bandes au nombre de 4 dont le maximum d'intensité correspondait aux longueurs d'onde suivantes :

a = 6035 Å, b = 5640 Å, c = 5480 Å, d = 5190 Å.

Si nous comparons le résultat ainsi obtenu avec le résultat antérieur (levure chromogène) on note que les quatre bandes

de la levure en apparence achromogène correspondent à peu près avec quatre bandes du spectre de la levure pigmentée. On observe un léger décalage pour 5645 et surtout 5200.

Nous avons effectué des expériences analogues en plaçant l'organisme levurien dans une atmosphérique de gaz carbonique (ce qui ne nuit pas à l'énergie vitale du *Cryptococcus*). En soumettant l'organisme ensuite aux mêmes analyses spectroscopiques le spectre ne donne plus de bandes d'absorption. En présence de ce phénomène, nous nous sommes rappellés des beaux travaux de KEILIN (91) en Angleterre et de FISCHER (92) en Allemagne. Ces auteurs ont pu démontrer l'existence d'un pigment respiratoire intracellulaire commun aux microorganismes, aux plantes et aux animaux qu'ils ont dénommé cytochrome et dont le spectre présente quatre bandes qui ont été fixées pour les muscles thoraciques de l'*abeille* à :

a = 6046, b = 5665, c = 5502, d = 5210.

Pour le *bacille subtilis* à :
a = 6032, b = 5660 , c = 5502, d = 5210,

Pour la *levure des boulangers* à :
a = 6035, b = 5645, c = 5490, d = 5190.

Nous voyons donc que nos quatre bandes d'absorption observées à la microanalyse de la levure *Cryptococcus corallinus* à l'état achromogène sont tout à fait comparables à celles constatées par KEILIN et FISCHER sur des organismes très divers. Nous avons donc, dans notre levure, affaire avec un organisme très aérophile et des sept bandes d'absorption constatées antérieurement, il n'y a que trois bandes différentes imputables au pigment rouge même. Cependant en examinant notre levure chromogène après l'avoir placée pendant 48 heures dans une atmosphère de gaz carbonique, nous pouvons constater à l'examen microspectroscopique encore la présence de quatre bandes situées à :

a = 6220, b = 5800, c = 5200 et d = 4900.

La bande d est toujours très faible, difficilement fixable. Quand à la bande c = 5200, nous voyons que chez la levure en aérobiose elle correspond à la bande f; chez la levure achromogène elle correspond à la bande d située à 5190. Il y a

donc chez la levure normale et chromogène superposition des deux bandes appartenant à deux pigments différents coéxistants simultanément. Ceci permet d'expliquer le fait mentionné lors de l'étude de la levure même suivant lequel cette bande a toujours un aspect estompé.

Le pigment purifié a été examiné en solution aqueuse alcaline à une concentration de 0,1 % et à un pH de 8,6, sous une épaisseur de 10 millimètres, le pigment donne les bandes d'absorption suivantes :

λ = 630 à 610 avec un maximum d'intensité pour λ = 622

Une deuxième bande d'absorption plus large est située entre :

λ = 590 et λ = 560 avec un maximum pour λ = 580

La troisième bande d'absorption s'étend entre :

λ = 523 et λ = 517 avec son maximum d'intensité à λ = 520

La quatrième bande très faible est mal délimitée a son maximum d'intensité à λ = 489. (Fig. 6)

La solution éthérée obtenue par épuisement de la solution hydrolysée a été évaporée et le résidu pesé a été dissout dans une solution aqueuse de pH = 5,6; la concentration mesurée par double pesée du résidu était de 0,032 %. La solution présentait une teinte jaune citron; examinée spectroscopiquement sous une épaisseur de 70 millimètres, donnait une absorption totale à partir de λ = 500. (Fig. 7)

Une troisième solution hydroalcoolique a un pH acide de 5,6, possède une teinte orangé jaune et donne à l'examen spectroscopique sous une épaisseur de 30 millimètres les bandes d'absorption suivantes :

La première très bien limitée entre 618 et 616; la deuxième s'étend entre λ = 600 et λ 570 avec son maximum à 580. Une troisième donne une absorption totale à partir de λ = 510. (Fig. 8)

La solution éthérée même à une concentration de 1 % donne une absorption totale à partir de λ = 490. (Fig. 9)

Le pigment isolé du *Cryptococcus radiatus* nous a montré au spectroscope des bandes d'absorption absolument comparables à celles obtenues avec le *Cryptococcus corallinus* chromogène et placé pendant 48 heures dans une atmosphère de gaz carbonique, c'est-à-dire avec les bandes caractéristiques du pigment *oxycétonique*.

Les différentes solutions que nous avons soumises à l'examen spectroscopique ont été examinées au point de vue de la fluorescence à la lumière de Wood dans les rayons ultra-violets.

Le pigment en solution aqueuse alcaline légèrement violette à la lumière du jour ne présente, exposé à ces rayons ultra-violets filtrés, aucune fluorescence.

La solution hydroalcoolique acide d'une teinte orangée jaune à la lumière du jour donne une fluorescence laiteuse légèrement verdâtre.

La solution éthérée acide est fluorescente avec une légère teinte verdâtre.

La solution éthérée même du pigment ne présente aucune fluorescence.

Il est bien entendu qu'au cours de ces expériences tous les solvants ont été soumis au même examen et qu'ils n'ont présenté aucun phénomène de fluorescence.

Analyse ionométrique du pigment :

Lors de l'étude sur les caractères culturaux de nos champignons, nous avons constaté que l'apparition de la substance chromogène est en rapport direct avec la concentration en ions H du milieu : celle-ci est même le facteur primordial, qui joue dans l'apparition de la substance chromogène, tandis que la température n'agit que secondairement. Ceci est encore plus vrai pour le *Cryptococcus radiatus* que pour le *Cryptococcus corallinus.*

Afin de contrôler l'influence de la réaction sur le pigment même, nous avons effectué quelques dosages potentiométriques avec des solutions du pigment purifié, ajustées à différents pH. Nous avons ainsi préparé une échelle de tampons à l'aide du potentiomètre à l'électrode d'antimoine dont les pH étaient les suivants :

1,78 — 2,85 — 3,76 — 4,39 — 5,47 — 6,05 — 7,45, 8,80 — 10,39.

La substance chromogène étant très peu soluble dans les solutions acides, nous avons dissous 0,02 gr. de matière colorante dans des traces d'alcool amylique; cette solution

a été ensuite mélangée avec les tampons acides. Nous avons ainsi pu constater que les pigments prenaient une teinte orangée jaune très vive dans les pH acides de 1,78 à 5,47.

D'autre part, la coloration de la solution du pigment vire au violet améthyste à partir du pH de 8,6; entre ces deux limites de 5,47 et 8,6 les solutions du colorant ont une teinte peu prononcée très légèrement jaunâtre. Il existe donc un espace très large de part et d'autre du point de neutralité, où on ne remarque aucun virage.

Chapitre VI

Considérations générales sur les pigments oxycétoniques chez les champignons

Ayant ainsi pu constater la présence, chez nos deux *Cryptococcus*, d'un pigment *oxycétonique*, nous voudrions insister quelque peu ici sur la signification de cette matière chromogène et sur les fonctions qui pourraient lui incomber, ainsi que sur les recherches antérieures aux nôtres ayant trait à ces dérivés *oxyanthraquinoniques* chez les champignons.

Au point de vue chimique, on a pu isoler jusqu'à présent des pigments mycosiques appartenant à trois groupes principalement : ce sont les *lipochromes*, les pigments *oxyanthraquinoniques* et des *colorants résineux*. Nous n'insisterons pas sur les *carotinoïdes* qui existent très fréquemment chez tous les végétaux.

Les pigments *oxyanthraquinoniques* ont été trouvés et ont fait l'objet d'études détaillées chez les champignons supérieurs; nous mentionnerons ici les travaux fondamentaux de Stahlschmidt (93) sur l'*acide polyporique* isolé du *Polyporus purpurescens* et du *Polyporus igniarius*. Il s'agit d'un colorant jaunâtre ou jaune rougeâtre, dont le noyau *oxyanthraquinonique* est nettement établi.

Bachmann (94) a étudié la substance chromogène du *Telamonia armillata Fr.*; c'est une substance rouge qui est insoluble dans l'alcool et l'éther, mais soluble dans des solutions alcalines aqueuses ou alcooliques en virant au rouge violet; par acidification il y a précipitation de flocons rougeâtres solubles dans l'éther et la solution résiduelle prend une teinte jaunâtre. L'auteur indique pour sa substance chromogène le spectre suivant, déterminé sur une solution diluée et sous une épaisseur de 55 millimètres : les bandes

suivantes sont visibles : a = 725—685, b = 564—540, c = 524—491, d = 460. En comparant ces détails donnés par l'auteur, on se rend compte de la proche parenté de son pigment avec le nôtre.

Oudemans (95) a étudié le colorant rouge du *Gastéromycète : Rhizopogon rubescens Cord.* Ce pigment est insoluble dans l'eau, soluble après traitement par un acide dans l'éther, dans le chloroforme et l'alcool. Il est soluble dans les solutions alcalines et précipite par l'addition de solutions acides. La cristallisation dans l'éther aboutit à des aiguilles rouges; le point de fusion de ce corps est situé à + 127°. L'auteur a établi la formule suivante pour son colorant :

$$C^{14} H^{18} O^{2}.$$

D'après ces données il semble que ce pigment fait aussi partie du groupe des *oxyanthraquinones.*

Fritsch (96) a étudié le pigment brun de *Polysaccum pisocarpium Fr.* Les propriétés de ce pigment sont à peu près analogues à celles que nous avons citées antérieurement et Fritsch le classe dans le même groupe.

Nous ne trouvons pas nécessaire d'insister sur la présence de ces pigments chez les végétaux supérieurs, car ce serait sortir du cadre de notre sujet et les recherches effectuées sur le *Rubia tinctoria* concernant l'*alizarine* et les différents *Rheum et Rumex* ayant trait à l'*acide chrysophanique* sont entrées dans le domaine classique.

Quant à l'élaboration, par le champignon, des pigments levuriens que nous avons étudiés, il ne nous a pas été donné d'éclaircir cette question. Nous avons bien pu observer par la carbonisation la présence de *pyrocatéchine,* nous avons d'autre part en mettant en présence notre pigment purifié et de l'acide sulfurique concentré et en chauffant à 200° essayé de le dégrader. Au cours de cette analyse on constate l'apparition d'une coloration rouge vif très nette, qui est très probablement due à la production d'*alizarine ;* en même temps nous avons pu démontrer l'existence dans cette solution de traces de *pyrocatéchine*; il ne nous a été malheureusement pas possible de fixer la présence d'acide *phtalique,* de sorte que nous ne pouvons pas apporter ici une preuve certaine sur la synthèse de notre matière colorante.

Nous avons étudié au cours de ce travail les conditions physiques et chimiques de la production du pigment, mais les raisons intimes concernant l'utilité de ces matières colorantes pour les champignons, nous sont restées obscures. Est-ce un simple produit de désassimilation tel que BACHMANN le suppose dans ses études biochimiques et physiologiques. Est-il en relation comme le *cytochrome* avec les phénomènes respiratoires ou fermentatifs ? Nous n'avons pu résoudre ces problèmes. C'est un glucoside du groupe *oxyanthraquinonique,* résultant d'un hydrate de carbone assimilable par les organismes étudiés.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'ensemble de nos recherches nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Nous avons pu isoler deux espèces cryptogamiques nouvelles appartenant à la famille des Non-Saccharomycétées et au genre *Cryptococcus* de KÜTZING-VUILLEMIN.

La première : *Cryptococcus corallinus* a été trouvée dans des prélèvements de cheveux opérés sur un malade qui présentait des lésions rappelant les kérions trichophytiques. Le champignon ne cultivait à partir du matériel pathologique qu'à la température de + 37° et seulement sur milieu de SABOURAUD glucosé. Généralement les cellules ne bourgeonnent que d'un seul côté. A + 37° l'espèce étudiée présente une teinte blanc crème; les cultures disposées à + 27° montrent une coloration qui va du rose au rouge saumon ou corail.

La deuxième *Cryptococcus radiatus* provient de cultures pratiquées à partir de poils prélevés sur des membres d'une congrégation religieuse du *Haut-Rhin*, à la suite d'une épidémie de chute de cheveux survenue dans le couvent. La culture est rapide sur tous les milieux. Les colonies sont toujours colorées même à la température de + 37°. La teinte est d'un beau rose, plus claire que celle de l'organisme précédent.

Après avoir décrit les caractères morphologiques de nos deux espèces, nous avons étudié leurs propriétés biologiques et biochimiques. Nous retiendrons particulièrement l'action sur les différents sucres et autres hydrates de carbone expérimentés : en effet le *Cryptococcus corallinus* est incapable d'utiliser le levulose; le lactose est un milieu très médiocre ainsi que le mannose. Les glucose, galactose, saccharose,

maltose sont de bons aliments ainsi que l'amidon. Le *Cryptococcus radiatus* n'utilise pas le galactose, le mannose et le lactose. Le lévulose est un sucre d'intérêt médiocre pour la nutrition de ce champignon. Le glucose, le saccharose et le maltose sont de bons aliments qui favorisent la croissance de cette espèce.

Pour les deux levures étudiées, quel que soit le sucre assimilable introduit dans les milieux de culture, l'apparition de la coloration se fait, dans les conditions exposées, au bout du même temps et avec la même intensité. Nos deux *Cryptococcus* ne liquéfient jamais le sérum coagulé, ni l'albumine d'œuf coagulée. En ce qui concerne la gélatine nous avons pu observer la liquéfaction totale du milieu par le *Cryptococcus corallinus* alors que le *Cryptococcus radiatus* n'a en aucun cas attaqué la gélatine. Les milieux de lait ont été coagulés par le *C. corallinus* alors que le *Cr. radiatus* n'a aucune action sur cette substance. Ni l'un, ni l'autre de nos microorganismes n'ont montré de pouvoir pathogène pour le cobaye et la souris blanche.

2° Nous avons étudié les conditions d'apparition des deux pigments sécrétés par les *Cryptococcus* : à ce point de vue notons tout d'abord la nécessité absolue de l'aliment hydrocarboné pour l'obtention du phénomène chromogène. Par contre la fonction pigmentaire ne dépend pas de la présence d'une substance quaternaire dans le milieu de culture. Enfin, la suppression de tel élément minéral ou de tel autre, n'ont pu détruire la pigmentation. L'oxygène est un élément indispensable à la fois pour la croissance de nos deux levures et pour l'apparition des substances chromogènes.

En ce qui concerne l'influence de la température, nous avons pu démontrer que pour le *Cryptococcus corallinus*, le pigment n'apparaît en aucun cas à la température de + 37°. Comme limites de température pour la production de la substance chromogène, nos expériences nous ont montré que le phénomène avait lieu entre des températures comprises entre + 8° et + 28°. Pour le *Cryptococcus radiatus* les nuances de teinte sont beaucoup moins sujettes à variation : la teinte est stable pour les températures comprises entre + 12° et + 37°.

Pour nos deux levures l'apparition de la coloration est en rapport direct avec la concentration du milieu de culture en ions H. Le maximum de pigmentation se montre pour un pH = 5,5.

Au point de vue de la localisation de la substance colorante, nous dirons ici que nos deux organismes se rangent dans les microorganismes chromophores.

3° Nos recherches effectuées dans le but de pratiquer l'isolement et la caractérisation des deux pigments, nous ont fait aboutir aux conclusions suivantes : les deux pigments isolés de nos levures se classent dans le groupe des dérivés oxycétoniques, dans la classe des oxyanthraquinones à noyau dicétonique non sulfoné.

L'analyse élémentaire nous a donné les pourcentages suivants :

C = 73,39 %
H = 4,95 %

Le poids moléculaire de la substance chromogène déterminé par la méthode cryoscopique est de : 294. Nos recherches nous ont en outre montré que le pigment doit rentrer dans le groupe de glucosides.

Le *Cryptococcus corallinus* présente à l'examen microspectroscopique sept bandes d'absorption dont quatre correspondent à celles du *cytochrome* de Keilin et Fischer. D'autre part il y a superposition de deux bandes appartenant l'une au cytochrome, l'autre au spectre d'absorption du colorant rouge.

Les deux pigments isolés des deux levures nous donnent des spectres d'absorption absolument comparables entre eux, caractéristiques du pigment oxycétonique.

Les raisons intimes concernant l'élaboration de la matière colorante, l'utilité de celle-ci nous sont restées obscures. Notre pigment est un glucoside du groupe oxyanthraquinonique apparaissant sur les cultures effectuées sur des milieux contenant un hydrate de carbone assimilable par les microorganismes étudiés.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

55 Arnaud : *C. R. Ac. Sc.*, t. CII, p. 1119, 1319; 1886. *Journ. Pharm. Chim.*, t. XIV, p. 149.

94 Bachmann : Pilzfarbstoffe, Planen, 1886, p. 14.

35 — Spektroskopische Untersuchungen von Pilzfarbstoffen, 1886.

83 Beijerinck : *Botan. Zeitung*, 1891, p. 726.

24 Bessey : Flora, t. XCIII, p. 301, 1904.

26 Boorsma : *Chemisch. Zentralblatt* 1896, t. I, page 1130.

77 Buschke et Harry : Beitrag zur Frage der Sporulationsfähigkeit parasitischer und pathogener Hefen. *Derm. Woch.* 1923, p. 357, t. 76, n° 17.

65 Combes : *C. R. Ac. Sc.*, 157, 1002 et 1454, 1913.

11 Demme : *Zentralbl. f. Bakt.* 1890, 9, p. 271.

59 Dhéré et Rywcki : *Journ. Physiol. et Path. génér.*, t. XVI et XVIII, 1915-1919.

29 Dragendorff : *Chem. Zentralbl.* 1878, p. 125, 1877, p. 350.

16 Elfvings : *Oefversigt. af Finska Vetensk. Soc. Föfh.*, Bd. 28.

78 Engel : Les ferments alcooliques. *Thèse Sciences*, Paris, 1872.

68 Erdmann : *Journ. f. praktisch. Chem.*, Leipzig, 1866, p. 385.

20 Fischer et Brebeck : Zur Morphologie, Biologie und Systematik der Kammpilze der Monilia candida u. des Soorerregers, Iéna, 1894.

92 Fischer et Fink : Ueber Koproporphyrinsynthese durch Hefe und ihre Beeinflussung. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1925, t. CXLIV, p. 101.

85 Frenkel : *Ann. Chim. anal. appl.* 18,1913, 58.

12 Fresenius : Beiträge zur Mykologie, 1850-1863.

89 Fresenius : *Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genussmittel*, 13, 1907, 132.

96 Fritsch : *Archiv. de Pharm.* 1889, p. 193.

84 Goppelsrœder : Note sur une méthode nouvelle propre à déterminer la nature d'un mélange de principes colorants : *Bull. Soc. Industr.* , Mulhouse, t. XXXII, 1862.

80 Gorodkowa : Ueber das Verfahren rasch die Sporen von Hefepilzen zu gewinnen. *Bull. Jard. Imp. Bot.*, Petersbourg, t. VIII, I, 5-6, 1908.

33 Griffiths : *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXII, p. 1342, 1896.

87 Grimbert-Lasseur : Sur l'extraction des pigments bactériens : *C. R. Soc. biol.*, 66e année, vol. 76, 1914, page 819.

4 Guilliermond : Les levures, *Encyclop. scient.*, Paris, Doin, 1912, p. 291.

63 — *Archives Anat. Micr.*, t. XIV, 1913.

14 Hansen : *Allgemein. Brauer- und Hopfenzeitung*, 1887, 27, p. 1109.

79 — Neue Untersuchungen über den Kreislauf der Hefearten in der Natur. *Zentralbl. f. Bakt.*, t. X, 1903.

54 Husemann : *Liebigs Ann.*, t. CXVII, p. 200, 1860.

19 Jansen et Mertens : La cellule, 1903, 20, 2e fasc., p. 351.

91 Keilin : Le Cytochrome, pigment respiratoire intracellulaire commun aux microorganismes, aux plantes et aux animaux : *C. R. Soc. biol.* 25, V, 1927.

82 Klinksieck et Valette : *Code des couleurs*, Paris, 1908.

58 Kohl : Untersuchungen über das Carotine, 1902.

18 Lasché : *Der Braumeister*, Chicago, 1892, nº 9.

71 Lasseur et Girardet : Contribution à l'étude des pigments microbiens, Nancy, 1927, page 44.

17 Laurent : *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, 2, p. 596.

1 Lindau : Die mikroskopischen Pilze, Julius Springer, Berlin, 1917.

15 LINDNER : *Wochenschr. f. Brauerei*, 1887, 4, p. 853.

27 LINOSSIER : *C. R. Ac. Sc.*, t. CXII, p. 489, 807, 1891.

23 MILBURN : *Zentralbl. f. Bakt.*, 2e partie, t. XIII, p. 269, 1904.

62 MOLISCH : Die Purpurbakterien, Iéna, Fischer, 1907.

61 NADSON : Die Pigmente der Pilze, 1891, *Bot. Zentralbl.*, t. L, p. 108, 1892.

5 OTA : Essai de classification des Blastomycètes pathogènes, *Ann. Par. hum. comp.*, t. II, nº 1, janvier 1924, p. 34-61.

6 — Beiträge zur Morphologie, Biologie u. Systematik der pathogenen asporogenen Sprosspilze. *Derm. Woch.*, 1924, 78, 216.

37 OUDEMANS : *Rec. Travaux Chim. Pays-Bas*, t. II, p. 155, 1883.

95 — *Rec. Travaux Chim. Pays-Bas*, t. II, p. 155, 1883.

64 OVERTON : *Jahrbuch für Wissen. Bot.*, t. XXXIII, p. 171, 1899.

32 PHILIPSON : *Chem. News*, vol. LVI, p. 199, 1882.

48 POUCHET : *Journ. Anat. et Physiol.* 1872, 1873, 1876.

25 PRINSEN-GEERLIGS : *Chemische Zeitung*, t. XIX, p. 1311, 1895.

31 REINKE : *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg*, t. 6, p. 74, 1886.

69 REINER-MULLER : *Zentralbl. f. Bakt. Orig.* I, 1908, 46, p. 209.

90 ROTA : *Chem. Zeitung*, 22, 1898, 437.

73 A. SARTORY : Etude biologique sur le Cryptococcus salmoneus : *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXIII, 1er fasc. 1907.

45 SARTORY (A.) et BAINIER : Etude biol. et morphol. de certains Aspergillus à pigment : *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXVII, 4e fasc. 1911.

40 — Etude biologique et morphologique de certains Aspergillus. *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXVII, 3e fasc. 1911.

46 A. Sartory et Bainier : Etude biologique et morphologique de certains Aspergillus. *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXVII, 3e fasc. 1912.

47 — Etude de quelques Citromyces nouveaux. *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXVIII, 1er fasc. 1912.

41 — Etude d'un Penicillium nouveau : P. Herquei. *Bull. Mycol. France*, t. XXVIII, 2e fasc. 1912.

42 — Etude de deux Penicillium nouveaux producteurs de pigment. *Bull. Soc. Mycol. France*, t. XXVIII, 3e fasc., 1912.

44 — Etude morphologique et biologique d'un Penicillium nouveau : Penicillium Petchii. *Ann. Myvol.*, vol. XI. no 3, 1913.

43 A. Sartory et Orticoni : Etude biologique d'un Cryptococcus et d'un Oidium rose. *Soc. Path. comp.*, janvier 1914.

2 A. Sartory : Les champignons parasites de l'homme et des animaux : Idoux, Nancy, 1923.

74 A. Sartory, R. Sartory , G. Hufschmit et J. Meyer : Etude d'un Cryptococcus nouveau : Cryptococcus corallinus isolé de lésions rappelant les kérions trichophytiques. *C. R. Soc. Biol.*, juillet 1930.

81 A. Sartory, R. Sartory et J. Meyer : Etude botanique et biologique d'une nouvelle levure rose : Cryptococcus radiatus n. sp. *C. R. Soc. Biol.*, 13 février 1931, t. CVI, p. 597.

75 Sasakawa : Zur Systematik pathogener und parasitärer Hefen. *Zentralblatt f. Bakt.* 1922, no 88, 1re partie, p. 269.

50 Schimon : Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter niederer Pilze, München, 1911.

13 Schröter : Beiträge zur Biologie der Pflanzen : 2e cahier, 1872, p. 110.

76 Schumacher : Ueber den Nachweis des Bakterienkerns u. seine chemische Zusammensetzung : *Zentralbl. f. Bakt.*, 1re partie, orig., t. 97, cahiers 2-3, 1926.

70 SEVENET : Etude d'une bactérie chromogène nouvelle : Bac. citrulli Sartoryi. *Thèse Pharm.*, Strasbourg 1930.

8 SORBY : *Proc. Roy. Soc.*, 1873, vol. XXI, p. 457.

38 STAHLSCHMIDT : *Liebigs Annalen*, t. CXCV, p. 365, 1879.

93 — *Liebigs Annalen*, 187, p. 177 et 195, p. 365.

34 TAYLOR : *Inst. Bot. Jahresbericht*, 1889, t. I, page 53.

39 THIRY : Bacille polychrome et Actinomyces mordoré, Nancy, 1900, p. 90-92.

86 THUMM : Arbeit aus dem Bakt. Inst. Karlsruhe, I, 291, 1897.

57 TSCHIRSCH : Untersuchungen über das Chlorophyll. u. andere Pflanzenpigmente, 1884.

28 VAUQUELIN : *Ann. de Chimie et Physique*, t. 3, p. 337, 1816.

52 VAUQUELIN et BOUCHARDAT : *Journ. de Chim.* 1830, vol. LVIII, p. 65.

49 VERNE (J.) : Couleurs et pigments des êtres vivants, Paris, Colin, 1930.

3 VUILLEMIN : Les Blastomycètes parasites. *Revue générale des Sciences*, n° 16, 12e année, t. XII, 30. VIII, 1901.

22 — *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIV, p. 366, 1902.

51 WACKENRODER : Dissertation de Anthelminticis, Göttingen, 1826.

21 WEHMER : *Zentralbl. f. Bakt.*, 2e partie, t. 6, p. 362, 1900.

30 WEISS : *Wiener Akad. Sitzungsbericht*, t. XCI, I, p. 446, 1885.

56 WILLSTÆTTER et MIEG : voir EULER : Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, Braunschweig, 1908, 1re partie, p. 135.

66 WILLSTÆTTER et EVEREST : Untersuchungen über die Anthocyane. *Ann. der Chem.*, t. 401, 1913, p. 189, 196.

67 WILLSTÆTTER : Ueber Farbstoff der Blüten u. Früchte. *Sitzungsberichte Preuss. Akad. Wiss., Berlin*, 1914, I, p. 409.

88 Willstætter et Zechmeister : Synthese des Pelargonidins : *Sitzungsbericht Preuss. Akad. Wiss. Berlin*, 1914, II, p. 887.

72 Wrede et Hettche : Ueber das Prodogiosin, den roten Farbstoff des Bacillus prodigiosus . *Ber. d. Deutschen Chem. Gesellsch.*, 1929, 62, p. 2678.

72 Wrede et Strack : *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1924-1929.

53 Zeise : *Journ. Prakt. Chem.*, t. XL, p. 297, 1897.

60 Zopf : *Schenks Handbuch der Botanik*, t. IV, p. 418, 1890.

36 — *Flora*, 1889, p. 353 et *Beitrag Phys. u. Morphol. niederer Organismen*, 1892, cahier 2.

7 — *Beitrag zur Physiol. u. Morphol. niederer Org.*, cahier 2, 1892, p. 3.

9 — *Beitrag zur Physiol. u. Morphol. niederer Org.*, cahier 3, 1893, p. 26.

10 — *Bericht. bot. Gesellsch.*, t. XVIII, 1900, p. 466.

TABLE DES FIGURES

Fig. 1 — Aspect microscopique d'une culture de Cryptococcus corallinus sur milieu de Sabouraud glucosé (obj. 7 Ocul. Makam.).

» 2 — Aspect microscopique d'une culture de Cryptococcus radiatus sur milieu de Sabouraud glucosé (obj. 7 Ocul. Makam.).

» 3 — Aspect macroscopique d'une culture en plaque de Cryptococcus corallinus.

» 4 — Aspect macroscopique d'une culture en plaque de Cryptococcus radiatus.

» 5 — Aspect macroscopique de diverses cultures en tubes inclinés de Cryptococcus corallinus et Cryptococcus radiatus.

» 6 — Spectrogramme 1 du pigment purifié en solution aqueuse alcaline à une concentration de 0,1 % et à un pH de 8,6 sous une épaisseur de 10 millimètres.

» 7 — Spectrogramme 2 du pigment purifié en solution éthérée à une concentration de 0,032 % et sous une épaisseur de 70 millimètres.

8 — Spectrogramme 3 du pigment purifié en solution hydro-alcoolique à un pH de 5,6 et sous une épaisseur de 30 millimètres.

9 — Spectrogramme 4 du pigment en solution éthérée à une concentration de 1 % sous une épaisseur de 30 millimètres.

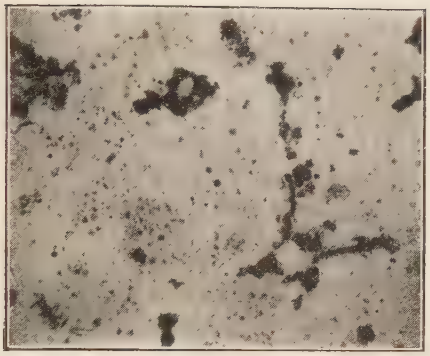


Fig. 1

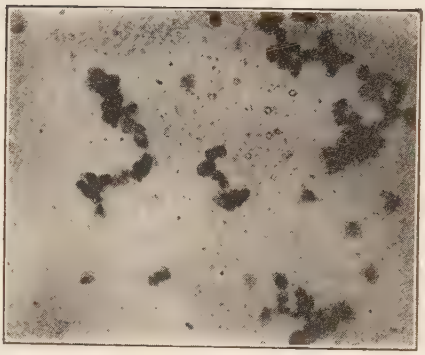


Fig. 2

Fig. 3

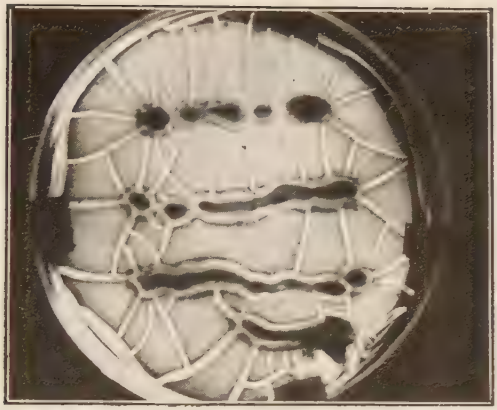


Fig. 4

Fig. 5

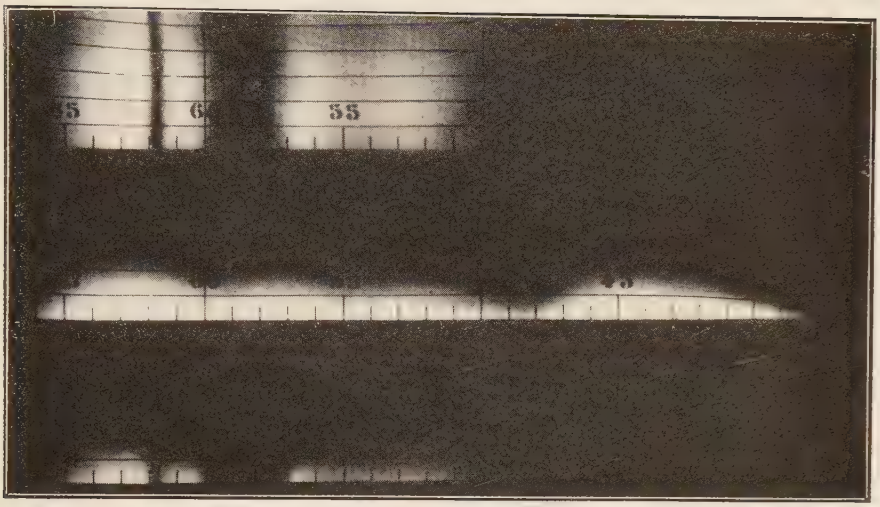


Fig. 8

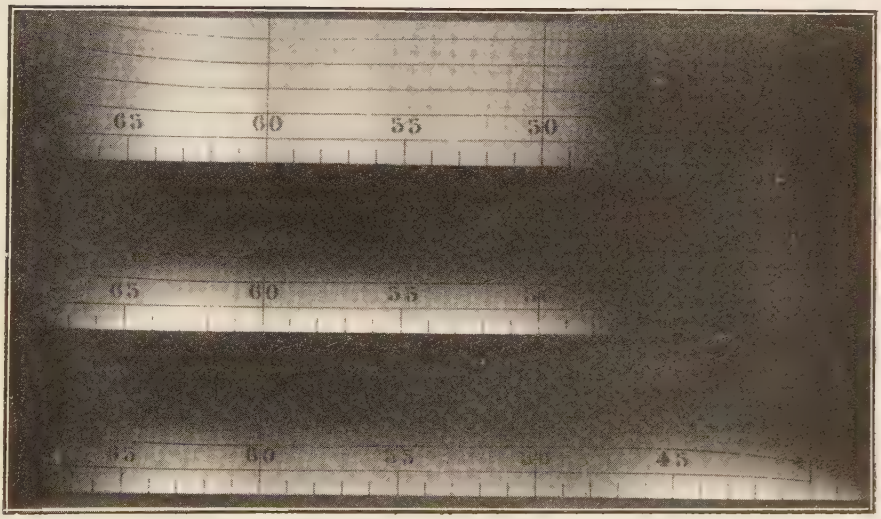


Fig. 9

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 1

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

Pages

CHAPITRE I. Caractères généraux de levure; leur place dans la classification 5

CHAPITRE II. Les champignons chromogènes 11

CHAPITRE III. Les principales substances chromogènes végétales étudiées jusqu'à présent 17

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I. Étude morphologique et biologique du *Cryptococcus corallinus ;* ses caractères culturaux et biochimiques 33

CHAPITRE II. Étude morphologique et biologique du *Cryptococcus radiatus ;* ses caractères culturaux et biochimiques 49

CHAPITRE III. Conditions d'apparition des deux pigments étudiés; leur localisation 59

CHAPITRE IV. Essais d'isolement des deux pigments 65

CHAPITRE V Recherches sur les propriétés physiques et chimiques des pigments étudiés 75

CHAPITRE VI. Considérations générales sur les pigments oxycétoniques chez les champignons 81

Concluisons générales 85

Notes bibliographiques 89

Table des figures 95

Table des matières 97

Vu :

Strasbourg, le 1er juillet 1931

Le Président du Jury,

A. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 1er juillet 1931

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

F. JADIN

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 1er juillet 1931

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

Ch. PFISTER

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg